



Universidade de
Aveiro
2017

Departamento de Química

Sofia Pereira Oliveira

**Regulamentação global: Foco em ésteres de 3-MCPD e
ésteres glicidílicos com base no parecer científico da EFSA
em 2016**



Sofia Pereira Oliveira

Regulamentação global: Foco em ésteres de 3-MCPD e ésteres de Glicidol, com base no parecer científico da EFSA em 2016

Relatório de Estágio apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ivonne Delgadillo do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Cátia Vaz da Dan Cake (Portugal), S.A.

Por acreditarem sempre em mim e que tudo seria possível, dedico este trabalho aos meus pais, irmã e namorado.

O júri

Presidente

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Carla Alexandra Pina da Cruz Nunes
Professora auxiliar convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof.^a Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
Professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Há dois anos atrás, questionava-me se algum dia chegaria a escrever esta página, porque seria sinal de que alcancei a minha meta, a etapa final do mestrado. Agora o objetivo está cumprido e nada disto seria possível sem a colaboração de todos que, de que de uma forma ou de outra, colaboraram na realização desta etapa e aos quais não posso deixar de manifestar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à empresa que me acolheu durante o meu estágio curricular, a Dan Cake (Portugal), S.A. Sem dúvida que me proporcionaram um estágio deveras enriquecedor e deram-me a oportunidade de integrar a fantástica equipa que têm, mas também pela forma prestável como fui acolhida. Um especial obrigado à Dra. Cátia Vaz, por toda a orientação, paciência, apoio, sugestões, disponibilidade e ajuda que me foi dando e que permitiu a realização do presente relatório de estágio. Um enorme obrigado a todos as pessoas, entre elas Eng^a. Lúcia Rodrigues, Carina Pereira, Diana Dias e Sandra Andrade que contribuíram para uma melhor compreensão de todo o funcionamento da empresa e por toda a disponibilidade que sempre mostraram ter.

Pela orientação, o meu agradecimento vai para a professora Ivonne Delgadillo, por ter aceite orientar o meu estágio, pelo seu aconselhamento e disponibilidade que sempre teve para me ajudar durante este percurso.

O agradecimento mais sentido é para quem mais o merece, aos meus magníficos pais, Idalina Cardoso e Rui Oliveira, e à melhor de todas as irmãs, Joana Oliveira, que sempre deram o apoio e as condições para chegar até aqui, sem as quais não seria de todo possível concretizar esta etapa final, um eterno obrigado. Um enorme obrigado ao meu namorado, António Coutinho, por ter sido incansável e com uma paciência invejável, por ter estado ao meu lado nos momentos em que mais precisei, por nunca me deixar desistir e por me permitir acreditar que existem realmente corações enormes neste mundo.

Por fim agradecer aos melhores amigos que sempre acreditaram e tiveram a palavra certa no momento certo. Seriam imensos os nomes que teria de escrever neste pequeno espaço e, a medo que faltasse algum, não o farei acreditando que cada um deles sabe que serão para sempre importantes.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”

Sócrates

palavras-chave	EFSA, Contaminantes, Ésteres de 3-MCPD, Ésteres Glicídilícos, Alimentos, Rotulagem, Segurança e Qualidade Alimentar.
resumo	<p>O presente trabalho descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular efetuado na empresa Dan Cake (Portugal), S.A., no âmbito do mestrado em Biotecnologia Alimentar.</p> <p>Em maio de 2016, o Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) publicou uma opinião científica sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença do 3-monocloropropano1,2-diol (3-MCPD), os seus ésteres de ácidos gordos e os ésteres glicídilícos (GE) nos alimentos. Estes são considerados genotóxicos e carcinogénicos, isto significa que ao longo do tempo podem danificar o DNA e causar cancro. Posto isto, a dose diária admissível (DDA) para o 3-MCPD e os seus ésteres foi reduzida de 2 µg/kg de peso corporal para 0,8 µg/kg de peso corporal.</p> <p>Um cliente Alemão exige que os produtos para ele vendidos apresentem metade da DDA surgindo, assim, a necessidade de acompanhar a empresa no estudo deste contaminante, para a nova formulação dos produtos, de forma a analisar o que pode ser feito por parte da mesma para mitigar os valores deste contaminante no produto final.</p> <p>Para melhor compreender o contaminante foram realizadas análises ao pão e às tostas da nova formulação das tostas com recurso a um laboratório externo. Foram também analisadas as matérias-primas utilizadas na formulação que condicionam o teor de 3-MCPD, o óleo de palma e o desmoldante, com recurso à técnica de infravermelho. As análises realizadas em laboratório externo permitiram perceber que poderá ocorrer um aumento de 3-MCPD durante o processo de tostagem e que o desmoldante poderá ter influência no teor do contaminante. Já a técnica de FT-IR não parece ser a técnica indicada para analisar este contaminante, contudo forneceu dados importantes a nível nutricional das tostas analisadas. Com os resultados das análises externas foram ainda conseguidos dados interessantes para futuras pesquisas.</p> <p>Além da investigação, o estágio integrou-se, na maior parte do tempo, em atividades desenvolvidas nos Departamentos de Rotulagem, através da prestação de informação aos consumidores sobre géneros alimentícios, e no Departamento de Segurança e Qualidade Alimentar, realização de inspeções mensais às linhas de produção.</p>

keywords

EFSA, Contaminant, 3-MCPD esters, Glycidyl esters, Food, Labeling, Food Quality and Safety.

abstract

The present work describes the activities developed during the curricular internship at the company Dan Cake (Portugal), S.A., within the scope of the Master's Degree in Food Biotechnology.

In May 2016 the European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain published a scientific opinion on the public health risks associated with the presence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPDs), their fatty acid esters and the glycidyl esters (GE) in food. These are considered genotoxic and carcinogenic, this means that over time they can damage the DNA and cause cancer. Thereafter, the allowable daily intake (DDA) for 3-MCPD and its esters was reduced from 2 µg / kg body weight to 0.8 µg / kg body weight.

One of the company's clients demands that the products sold to them present half of the TDI therefore, the need arose to follow the company in a study for this contaminant in order to analyze what could be done by the same to mitigate the values of this contaminant in the final product.

To understand the contaminant better, analyzes were carried out on a recipe of sold toasts using analyzes in an external laboratory and analyzes of the raw materials at risk using the FT-IR technique in order to assist the company in the acquisition of knowledge. The analysis carried out in an external laboratory showed that an increase of 3-MCPD may occur during the roasting process and that the release agent may influence the contaminant content. The FT-IR technique does not seem to be the indicated technique to analyze this contaminant; however, it provided important nutritional data of the analyzed toasts. With the results of the external analyzes, interesting data were also obtained for future research.

In addition to this investigation. the internship had most of the time the direct contact with activities developed in the Departments of Labeling and Security and Food Quality.

Índice

Índice	xvii
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xix
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e objetivos.....	1
1.2 Empresa	2
1.3 Estado da arte.....	4
1.3.1 Legislação Europeia – EFSA	4
1.3.2 Contaminantes de processo	5
1.3.3 Refinação de óleos vegetais	10
1.3.4 Catalisadores da formação nos óleos vegetais	14
1.3.5 Formação de 3-MCPDE e GE nos alimentos.....	15
1.3.6 Possíveis formas de minimizar.....	16
1.3.7 Metabolismo no organismo humano	21
1.3.8 Perigos para a saúde humana	22
1.3.9 Métodos de análise	23
1.3.10 Legislação mundial.....	26
Capítulo II – Estudo e compreensão do composto 3-MCPD e dos seus ésteres	29
2.1 Introdução	29
2.1.1 Materiais e Métodos	31
2.2 Resultados e Discussão	36
2.2.1 Análises ao produto.....	36
2.2.2 Análises às matérias primas	38
2.2.3 Alternativas ao óleo de palma	45
2.3 Conclusões e Perspetivas Futuras	48
Capítulo III - Atividades desenvolvidas na empresa.....	51
3.1 Departamento de Rotulagem e Embalagem.....	51
3.2 Departamento da Qualidade.....	56
3.3 Conclusão.....	59
Capítulo IV – Bibliografia.....	61

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas do 3-MCPD e seus ésteres ⁷ .	6
Figura 2: Estruturas químicas do glicidol e do seu éster ⁷ .	7
Figura 3: Níveis de GE e 3-MCPD em diferentes tipos de alimentos em µg/kg, recolhidos de 2012 a 2015 ¹⁸ .	8
Figura 4: Etapas da refinação física dos óleos vegetais, adaptado de ²⁶ .	12
Figura 5: Etapas da refinação química dos óleos vegetais, adaptado de ²⁶ .	12
Figura 6: Níveis de GE e 3-MCPD nos diferentes tipos de óleos e gorduras em µg/kg, recolhidos de 2012 a 2015 ¹⁸ .	13
Figura 7: Evolução desde 2011 a 2015 de 3-MCPDE nos diferentes tipos de óleos ¹² .	18
Figura 8: Evolução desde 2011 a 2015 de GE nos diferentes tipos de óleos ¹² .	19
Figura 9: Etapas de formação das tostas estudadas.	30
Figura 10: Fluxograma de processo de fabrico das tostas, adaptado.	32
Figura 11: Espectro de FTIR do composto 3-MCPD.	39
Figura 12: Espectro FT-IR do óleo de palma novo e antigo.	40
Figura 13: Espectro comparativo do óleo de palma novo, óleo de palma antigo e óleo de palma antigo contaminado com 3-MCPD.	41
Figura 14: Espectros FT-IR do óleo de palma e do desmoldante.	42
Figura 15: Espectros FT-IR da gordura extraída com hexano da tosta com o desmoldante.	43
Figura 16: Espectro FT-IR comparativo da gordura extraída com clorofórmio da tosta com o óleo de palma.	44

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Legislação relativa a 3-MCPD, 3-MCPDE e GE. a entrar em vigor até 2018.	27
Tabela 1.2: Teores máximos para GE a entrar em vigor em 2019	28
Tabela 3: Valores máximos de 3-MCPD e 3-MCPDE para adultos.	30
Tabela 2.4: Resultados analíticos referentes a análises de 3-MCPD nas amostras em estudo.	36
Tabela 2.5: Resultados analíticos de 3-MCPD/kg gordura e de 3-MCPD/50g para cada amostra analisada.	37
Tabela 2.6: Níveis médios de 3-MCPDE e GE com recurso ao processo de refinação convencional.	45
Tabela 2.7: Níveis médios de 3-MCPDE e GE após alterações ao processo de refinação.	46

Lista de Abreviaturas

- 1,3-DCP-** 1,2-dicloropropano-2-ol
2-MCPD- 2-monocloropropano-1,3-diol
2,3-DCP- 2,3-dicloropropano-1-ol
2-MCPD- 2-monocloropropano-1,3-diol
3-MCPD- 3-monocloropropano-1,2-diol
3-MCPDE- ésteres de 3-MCP
aW- atividade da água
FFA- ácidos gordos livres
BfR- Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos
BRC- British Retail Consortium – Global Standard for Food Safety
CCA- Comissão do *Codex Alimentarius*
CE- Comissão Europeia
CONTAM Panel- Painel sobre Contaminantes da Cadeia Alimentar
DAG- Diacilglicerol
DDA- Dose diária admissível
EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
FAO- Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
GE- Ésteres de glicidol
IARC- Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro
IFS- International Featured Standards
IR- Espectroscopia de Infravermelho
JECFA- Comité Misto FAO / OMS de Peritos em Aditivos Alimentares
MAG- Monoacilglicerol
MCPDs- Monocloropropanodióis
OGM- Organismo Geneticamente Modificado
OMS- Organização Mundial da Saúde
PPM- Partes Por Milhão
PVH- Proteína vegetal hidrolisada
PVH ácida- Proteína vegetal hidrolisada por ácido clorídrico
SCF- Comité Científico da Alimentação Humana
TAG- Triacilglicerol

Capítulo I – Introdução

1.1 Enquadramento e objetivos

Uma alimentação segura e equilibrada é do interesse de todos, dos consumidores das autoridades mundiais e até mesmo dos operadores. Nos últimos anos, as entidades alimentares de todo o mundo ostentam uma necessidade de implementação de medidas preventivas na indústria alimentar, com o intuito de garantir maior segurança e qualidade dos géneros alimentícios que chegam ao consumidor. Uma das preocupações destas entidades foca-se nos contaminantes presentes nos alimentos. O Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) publicou, em maio de 2016, uma opinião científica sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença dos 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) e 2-monocloropropanodiol (2-MCPD), os seus ésteres de ácidos gordos e os ésteres de ácidos gordos glicidílicos (GE) nos alimentos. O 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) e o glicidol são contaminantes de processo dos alimentos, conhecidos há já 30 anos. Recentemente, foi observada uma tendência da presença destes como ésteres de ácidos gordos em óleos vegetais e produtos derivados destes. O 3-MCPD foi associado a efeitos nocivos em órgãos de animais e, com isto, a dose diária admissível (DDA) para o 3-MCPD e os seus ésteres foi reduzida de 2 µg/kg de peso corporal para 0,8 µg/kg de peso corporal. Estes compostos são formados essencialmente a partir de substâncias naturalmente presentes nos óleos vegetais - os diacilgliceróis - quando os óleos são aquecidos a temperaturas superiores a 200°C durante a desodorização, etapa do processo de refinação. Embora os ésteres de 3-MCPD sejam encontrados principalmente no óleo de palma e noutros óleos vegetais, estes podem também ser encontrados em alimentos processados, particularmente em bolos e bolachas.

O principal objetivo do estágio foi acompanhar a empresa num estudo para este contaminante de forma a analisar o que poderia ser feito por parte da empresa para mitigar os valores deste contaminante no produto final, se seria um trabalho conjunto com fornecedores de matérias primas ou se seria um trabalho com foco no processo de produção. Este objetivo teve sempre como base o recente parecer científico da EFSA e os requisitos de um cliente da empresa. A sua consecução passou por estabelecer contacto direto com os fornecedores das matérias primas utilizadas no produto e com o cliente, bem como pela

realização de estratégias e análises a fim de compreender o comportamento do composto aquando do fabrico do produto.

No decorrer do estágio, foram também traçados mais dois objetivos. O segundo objetivo passou por uma participação direta na empresa, através do departamento de desenvolvimento, em particular, do departamento de embalagem e rotulagem dos produtos. Foi neste departamento que foi passada a maior parte do tempo e foi feito a maior parte do trabalho desenvolvido. Finalmente, mas não menos importante, o terceiro objetivo prendeu-se pela aquisição de experiência profissional a nível industrial e, neste caso, nas áreas de Rotulagem e de Qualidade e Segurança Alimentar.

1.2 Empresa

A Dan Cake (Portugal), S.A. é uma empresa portuguesa com sólida experiência que, desde 1978, opera na indústria de *bakery*. Foi neste ano, que a família Jamnadas, em parceria com a Dan Cake Dinamarca, inaugurou, na Póvoa de Santa Iria, a primeira linha de tortas e, poucos anos depois, em 1982, a unidade fabril de Coimbra, com duas linhas: uma de pipocas e outra de madalenas. Em 1984, foi iniciada a produção das famosas bolachas *Butter Cookies* e é em 1986 que a Dan Cake se torna uma empresa unicamente portuguesa. Em 1993 e 1994, as unidades fabris da Póvoa de Santa Iria e de Coimbra, respetivamente, foram reconstruídas a fim de acompanhar o crescimento que se vinha a sentir na empresa, aumentando a eficiência de produção e a competitividade. Em 2001, a Dan Cake adquire a certificação pela norma NP EN ISSO 9001 e, em 2005, certifica-se pelos referenciais BRC (3º versão, 2003) e IFS (4º versão, 2004). Em 2008, com a comemoração dos 30 anos da empresa, a Dan Cake decide apostar numa nova imagem, mas é em 2014 que ocorre um relançamento da marca e do portfólio, com nova imagem e novos produtos.

Nacionalmente, a empresa é conhecida pela marca Dan Cake e, internacionalmente, pela marca Danesita e Dan'Or. Do volume anual de produção da empresa, cerca de 75% é exportado para 82 países, entre eles e para além da Comunidade Europeia, os Estados Unidos, Filipinas, Brasil, África do Sul, China, Japão, Nova Zelândia, entre outros. A Dan Cake apresenta um vasto portefólio de produtos de pastelaria embalada, os biscoitos e bolachas, madalenas, queques e *muffins*, *waffles*, palitos, milfolhas, pipocas, *croissants* simples e recheados, tostas, tortas e bolos.

A visão da Dan Cake baseia-se em Receitas de Amor e segue o seguinte pensamento: “É este amor que junta as novas tecnologias e técnicas à forma tradicional de fazer a melhor pastelaria e, depois de ser envolvido com dedicação e recheado com os melhores ingredientes, resulta num produto final genuíno, com qualidade, e profundamente saboroso. É esta a receita que nos faz acreditar que, da primeira à última dentada, o vai apaixonar também”¹.

1.3 Estado da arte

1.3.1 Legislação Europeia – EFSA

Uma alimentação sã, de qualidade e variada é um direito de todos os cidadãos e, por isso, a informação sobre a composição, os processos de fabrico e a utilização dos géneros alimentícios deve ser clara e precisa ². A necessidade de desenvolver e implementar políticas específicas de alimentação e nutrição ganhou relevo após a II Guerra Mundial, com a criação, em 1945, da Organização das Nações Unidas (ONU) e da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e, posteriormente, em 1948, com a constituição da Organização Mundial da Saúde (OMS). Desde então, a formulação de políticas de alimentação e nutrição tem sido uma responsabilidade partilhada entre a FAO, com ênfase na melhoria da eficiência ao nível da produção, elaboração, comercialização e distribuição de alimentos, e a OMS, com ênfase para a nutrição relacionada com a manutenção ou melhoria do estado de saúde e prevenção da doença. Até à década de 70, considerava-se prioritária a implementação de políticas de alimentação e nutrição para os países mais pobres e em desenvolvimento, os quais possuíam dificuldades em garantir uma disponibilidade alimentar suficiente. A implementação destas políticas era também essencial em períodos de crise ou guerras, em que a disponibilidade alimentar poderia ficar comprometida ^{3,4}. Uma série de incidentes alimentares, no final dos anos 90, chamaram a atenção para a necessidade de estabelecer princípios e requisitos gerais relativos à legislação respeitante aos géneros alimentícios e aos alimentos para animais ao nível da União Europeia. Por conseguinte, a Comissão Europeia desenvolveu uma abordagem integrada em matéria de segurança dos alimentos, consagrada principalmente no seu Livro Branco sobre a Investigação no Domínio da Segurança Alimentar. Este abrange todos os setores da cadeia alimentar, incluindo a produção de alimentos para animais, a produção primária, a transformação de alimentos, o armazenamento, o transporte e a venda a retalho. Em 2002, o Parlamento e o Conselho Europeu adotaram o Regulamento (CE) n.º 178/2002, que estabelece os princípios e requisitos gerais da legislação alimentar. Nele é possível encontrar definido um quadro global e coerente para o desenvolvimento da legislação relativa aos géneros alimentícios e aos alimentos para animais, tanto a nível da União Europeia como a nível nacional. Para o efeito, estabelece princípios gerais, requisitos e procedimentos que fundamentam a tomada de decisões referentes à segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais,

abrangendo todas as fases da produção e distribuição. Estabelece, também, uma agência independente responsável pelo aconselhamento e apoio científicos, a EFSA.

A EFSA é a agência europeia financiada pela União Europeia que opera independentemente das instituições legislativas e executivas europeias (Comissão, Conselho e Parlamento) e Estados-Membros da UE. Esta é responsável pela avaliação de riscos e tem também o dever de comunicar os seus resultados científicos ao público. Como avaliadora de riscos, produz pareceres científicos que constituem a base das políticas e legislação europeias. A segurança alimentar e dos alimentos para animais, nutrição, saúde e bem-estar dos animais, proteção das plantas, fitossanidade são as áreas que abrange e, através de avaliações de riscos ambientais, estimam também o possível impacto da cadeia alimentar na biodiversidade dos habitats de plantas e animais. Na comunicação de resultados científicos, o seu objetivo é que as informações sejam apropriadas, precisas e oportunas sobre questões de segurança alimentar para aumentar a consciencialização e explicar as implicações das investigações científicas feitas. Os resultados científicos nem sempre são facilmente convertidos em simples orientações e conselhos que o senso comum pode entender. Assim, esta tarefa consiste em expor estes resultados de forma clara não só aos seus principais parceiros e partes interessadas, mas também ao público em geral, para ajudar a colmatar a lacuna entre a ciência e o consumidor. Desde a sua criação, a EFSA prestou pareceres científicos sobre uma vasta gama de questões, como a encefalopatia espongiforme bovina, a salmonela, os aditivos alimentares (como o aspartame), os ingredientes alimentares alergénicos, os contaminantes presentes em alimentos, os organismos geneticamente modificados, entre outros ⁵.

1.3.2 Contaminantes de processo

Durante o processamento de alimentos, pode ocorrer a formação de compostos tóxicos que, de forma não intencional, chegam à dieta do consumidor, conhecidos como contaminantes. Segundo o Regulamento (CEE) N° 315/93 do Conselho de 8 de fevereiro de 1993, entende-se por contaminante “qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada a um género alimentício mas nele esteja presente como resíduo da produção (incluindo os tratamentos aplicados às culturas e ao gado e na prática da medicina veterinária), fabrico, processamento, preparação, tratamento, acondicionamento, embalagem, transporte ou

armazenagem do referido alimento ou em resultado de contaminação ambiental”⁶. Olhando aos riscos que estes compostos podem representar para a saúde humana, existe uma elevada preocupação com o assunto por parte da comunidade científica. A exposição humana a este tipo de substâncias ocorre há várias gerações, mas, apenas por volta do ano de 1960, é que a sua presença em alimentos começou a ser descoberta e estudada⁷. Os cloropropanóis são um exemplo destes contaminantes químicos caracterizados por serem compostos clorados derivados do glicerol (1,2,3-propanotriol), apresentando um ou dois átomos de cloro em várias configurações na molécula de glicerol. Foi durante estudos realizados no Instituto de Tecnologia Química em Praga, por Veříšek *et al.* (1978)⁸, que a sua presença em alimentos foi detetada. Assim, os investigadores mostraram que este contaminante resulta da hidrólise por ácido clorídrico da proteína vegetal (PVH ácida). Vários cloropropanóis foram identificados através de estudos subsequentes realizados em PVH ácida por Davidek *et al.* (1980)⁹. Os principais compostos voláteis encontrados foram o 3-cloropropan-1-ol, o 1,3-dicloropropan-2-ol (1,3-DCP) e o 2,3-dicloropropan-1-ol (2,3-DCP). Os cloropropanóis não voláteis encontrados foram o 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD) e os seus ésteres, que correspondem a estruturas de cloropropanóis nas quais grupos hidroxilo estão esterificados com ácidos gordos (Figura 1).

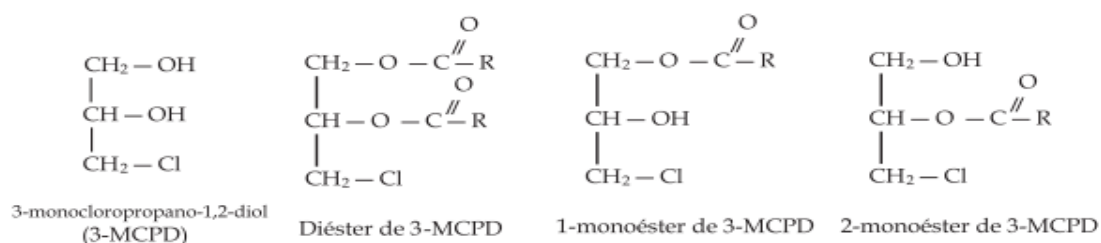


Figura 1: Estruturas químicas do 3-MCPD e seus ésteres⁷.

Os ésteres de 3- e 2-MCPD são produzidos, entre outras formas, no processo de refinação de óleos vegetais, mais especificamente na etapa de desodorização. Os ésteres contêm uma quantidade de ácidos gordos comum e numa razão semelhante aos óleos e gorduras parentais, embora alguns fatores, tais como as condições de volatilização e desodorização, possam causar algumas diferenças. Durante a refinação de óleos vegetais, o glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) é um composto associado à formação e decomposição de 3 e 2-MCPD, uma vez que é um metabolito deste processo. Neste processo, ocorre também a formação de

ésteres glicidílicos de ácidos gordos (GE). Os GE correspondem a formas ligadas do glicidol, compostos orgânicos caracterizados estruturalmente por uma molécula de glicerol contendo os grupos funcionais epóxido e álcool, nos quais o hidroxilo se encontra esterificado com um ácido gordo (Figura 2) ^{7,10-12}.



Figura 2: Estruturas químicas do glicidol e do seu éster ⁷.

Dos compostos pertencentes à classe dos cloropropanóis, o 3-MCPD foi o que, na última década, recebeu especial atenção pela comunidade científica mundial após detecção de altos níveis deste em diversos alimentos. Como referido anteriormente, este composto foi identificado, pela primeira vez, como contaminante resultante da produção e processamento de alimentos na PVH ácida, em 1978 ^{8,13}. Posto isto, o 3-MCPD e os seus ésteres ficaram conhecidos como contaminantes alimentares encontrados, originalmente, na proteína vegetal hidrolisada (PVH), principal fonte deste composto nos alimentos, e em molhos de soja. Acreditava-se, então, que estariam presentes apenas em alimentos preparados com estes. Contudo, novos estudos vieram contrariar esta ideia, mostrando que estes compostos estão presentes também em alimentos que não estabelecem relação com a PVH ¹⁴. Assim e para além das suas fontes, o 3-MCPD pode ser encontrado em diferentes ingredientes alimentares e produtos de pastelaria. Exemplos destes alimentos são os cereais de pequeno almoço, as salsichas fermentadas, a carne defumada, o pão torrado, os biscoitos salgados, o café, o malte, o queijo, os alimentos para bebés e crianças, o leite materno humano, a maionese, os produtos de panificação, os produtos de pastelaria, entre outros ¹⁵⁻¹⁷. A figura seguinte (Figura 3) expõe a presença e quantidade de ésteres de 3-MCPD (3-MCPDE) e de GE em diferentes alimentos.

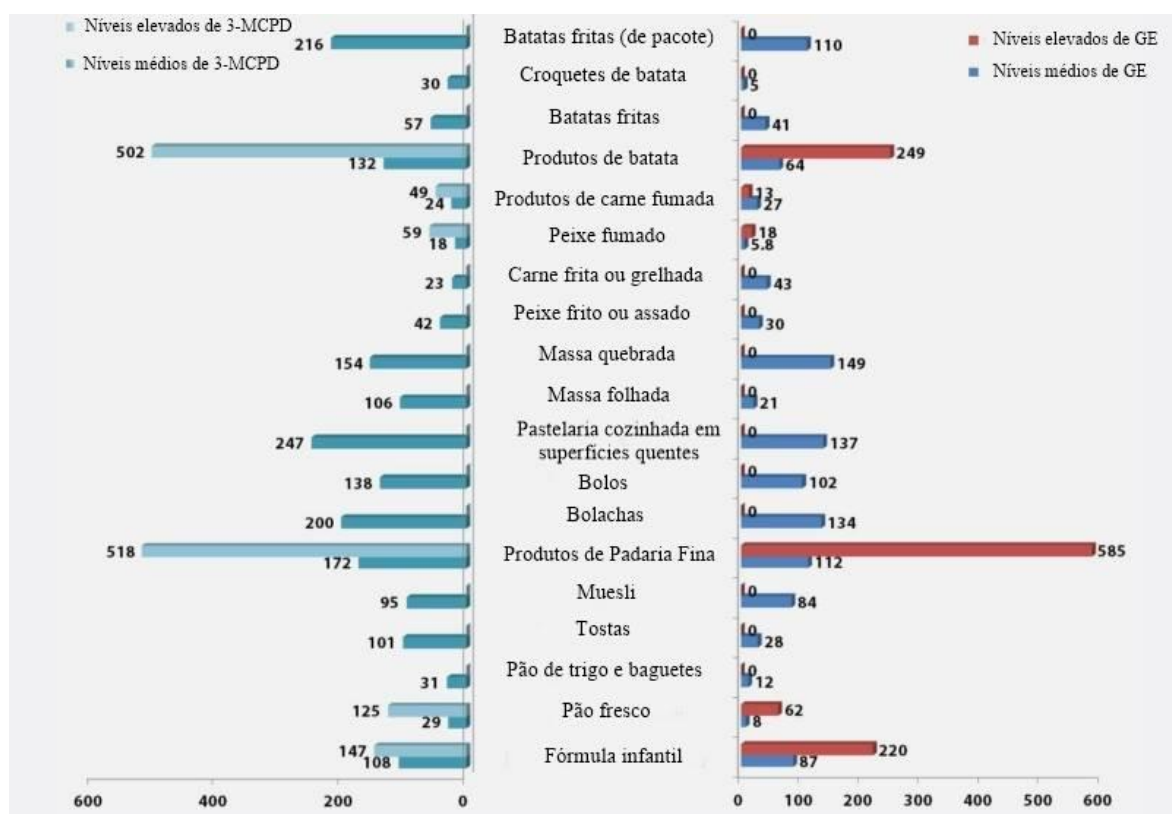


Figura 3: Níveis de GE e 3-MCPD em diferentes tipos de alimentos em µg/kg, recolhidos de 2012 a 2015 ¹⁸.

Como podemos verificar na Figura 3, a quantidade de 3-MCPDE varia dependendo dos diferentes tipos de alimentos. Assim, é possível agrupar os alimentos em três grandes grupos, o grupo dos alimentos termicamente processados, o grupo dos óleos e gorduras e, por fim, os alimentos infantis e leite materno humano ¹⁸⁻²⁰.

Os produtos derivados dos cereais e do malte e os alimentos fumados fazem parte do grupo dos alimentos termicamente processados. Estudos realizados a este grupo levaram os investigadores a concluir que são os produtos derivados dos cereais que apresentam os valores mais elevados deste contaminante. Assim, foi analisada a influência da exposição a altas temperaturas e dos ingredientes utilizados nos produtos derivados dos cereais na formação de 3-MCPD. Tanto a temperatura como os ingredientes utilizados, sendo que os que mais contribuem são a gordura assim como açúcares e emulsionantes, afetam a formação do contaminante. Em relação aos precursores de 3-MCPD, o glicerol ou compostos constituídos por glicerol, tais como monoacilgliceróis (MAGs) e fosfatidilgliceróis, aparentam ser os principais precursores. Nos produtos derivados do malte, tais como os grãos maltados e extratos de malte (corantes e aromatizantes), o tratamento térmico parece

desencadear também a formação de 3-MCPD. A diferença é que nestes são os componentes originais do malte os que provocam a formação e não os ingredientes adicionados. Nestes produtos, apenas a cerveja preta apresenta valores significativos, 247 µg/kg, deste contaminante. Os alimentos fumados contêm, também, quantidades significativas de 3-MCPD (>20 µg/kg), levando investigadores a analisar o efeito do fumo em salsichas fermentadas e presunto. Este evidencia ser a principal fonte de 3-MCPD, especialmente o tipo de madeira utilizada e a duração do processamento. Em contraste com os cereais e derivados do malte, nos alimentos fumados os lípidos não são considerados precursores, mas sim o mecanismo de formação da 3-hidroxiacetona durante a degradação de celulose e a concentração de sal usada na salmoura ²⁰.

O grupo dos alimentos infantis e leite materno humano engloba, como o próprio nome indica, alimentos destinados ao consumo por crianças. A necessidade de criar este grupo separadamente deve-se ao peso corporal dos consumidores visto que este contribui significativamente para a avaliação do risco em relação à exposição. O leite materno tem sido investigado tendo sido detetadas concentrações significativas de 3-MCPD. Contudo, este grupo de alimentos está ainda em estudo pois a dose diária recomendada é facilmente excedida ²⁰.

Embora os óleos e gorduras sejam processados a temperaturas elevadas durante a transformação industrial e durante a cozedura doméstica, este grupo de géneros alimentícios é apresentado separadamente. Os valores de 3-MCPD neste grupo varia entre <100 mg/kg em óleos virgens e 2462 mg/kg em óleos refinados mostrando, assim, que é o processo de refinação que induz um aumento significativo. Estudos realizados pela Agência de Testes Químicos e Veterinários de *Stuttgart* determinaram quantidades significativas de 3-MCPD em quase todas as amostras de óleos das 400 que analisaram. Dos diferentes tipos de óleos, o óleo de palma foi o que apresentou valores mais elevados, 4000 mg/kg, e, alimentos preparados com o mesmo apresentavam também quantidades significativas de 3-MCPD. Este é um grupo que necessita também de uma investigação mais alargada no que toca aos precursores e aos mecanismos de formação uma vez que contribui significativamente para a ingestão diária de 3-MCPD ²⁰. Este é o grupo de alimentos que mais atenção tem recebido por ser, na indústria alimentar, a matéria prima mais utilizada. Apresentam também uma grande importância na alimentação humana por representarem uma fonte de inúmeras

vitaminas lipossolúveis e ácidos gordos essenciais, além de que apresentam um elevado teor energético ²¹.

1.3.3 Refinação de óleos vegetais

A formação de ésteres de 3-MCPD, em óleos vegetais, está associada ao processo de refinação que estes sofrem, realizada para melhorar a aceitabilidade do consumidor.

Os óleos e as gorduras naturais são constituídos maioritariamente por triacilgliceróis (TAGs) os quais são formados pela esterificação completa de glicerol com ácidos gordos. Em óleos brutos, os triacilgliceróis representam cerca de 95% a 97% do total, já em óleos refinados podem representar mais de 99% do total. O restante, isto é, os componentes minoritários, são chamados da fração insaponificável. Fazem parte desta os esteróis, os hidrocarbonetos, os tocoferóis e os corantes ²².

A refinação caracteriza-se por um conjunto de vários processos que visam transformar os óleos brutos em óleos comestíveis. É através desta, que há a remoção de substâncias que podem afetar negativamente a aparência, o gosto e o tempo de vida dos óleos. Exemplos destas impurezas são os ácidos gordos livres, os fosfolípidos, os produtos de oxidação, os pigmentos, entre outros. O processo de refinação consiste, predominantemente, em dois métodos: a refinação química e a refinação física. Os métodos físicos removem os compostos indesejáveis por destilação através de um processo sustentado na grande diferença de volatilidade entre os ácidos gordos livres e o óleo neutro. Este método exhibe vantagens pois apresenta custos mais baixos, torna-se um método amigo do ambiente, por existir uma redução dos produtos químicos utilizados e as perdas de óleo são significativamente mais baixas. Nos métodos químicos, os ácidos gordos livres são neutralizados por uma base, o hidróxido de sódio, dando origem a um sabão que é removido por centrifugação. Este método apresenta algumas desvantagens, como uma perda de cerca de 30% de óleo, o alto custo associado, o elevado tempo de processo, a elevada quantidade de energia gasta e a libertação de poluentes para o meio ambiente. A refinação por processos físicos é aplicada normalmente a óleos com elevada acidez, como o óleo de palma, nos quais a refinação por processos químicos poderia originar elevadas perdas de óleo neutro ^{23,24}. A refinação dos óleos vegetais apresenta três operações principais, no entanto, esta passa por quatro etapas: a degomagem, considerada também como um pré-tratamento; a neutralização, operação

apenas da refinação química; o branqueamento e, por fim, a desodorização. A degomagem, primeira etapa e comum a ambos os tipos de refinação, tem como finalidade retirar dos óleos substâncias como fosfatídeos (lecitina, cefalina e fosfatidilinositol), proteínas ou fragmentos destas e substâncias coloidais, as chamadas gomas. Estas substâncias favorecem a degradação do óleo mediante ação enzimática e proliferação de fungos e bactérias e, por isso, é bastante importante que estas sejam removidas. Existem dois processos possíveis nesta etapa, a degomagem com água e a degomagem ácida. Na degomagem com água, é adicionada água com um teor igual ao do teor de gomas e, após a sua adição, a mistura é aquecida a 60-70° C em constante agitação durante 30 a 45 minutos. Seguidamente, a mistura é colocada numa centrífuga para que as gomas sejam separadas do óleo. Na degomagem ácida, o óleo é aquecido a 80 – 90° C com vapor saturado e, de seguida, é adicionado 0,1-0,3% de volume de ácido fosfórico concentrado. No final do processo, o ácido é retirado através de centrifugação. A etapa seguinte, a neutralização, visa a eliminação dos ácidos gordos livres do óleo e é aplicada apenas quando é feita refinação química. A eliminação destes é feita através da adição de hidróxido de sódio que irá neutralizar os ácidos gordos presentes no óleo, formando-se um sabão que é consistente e geralmente fácil de ser separado. Esta separação é feita através de centrifugação com uma secagem posterior do óleo realizada em tanques com agitadores e com sistema de aquecimento a vapor. O aquecimento é feito também em vácuo para evitar a oxidação e promover uma rápida secagem do óleo. Quando este está seco e a uma temperatura à volta dos 80°C, é realizado o branqueamento, etapa novamente comum à refinação química e física. Esta etapa centra-se na adição da argila descolorante que, por adsorção, remove os pigmentos presentes. Por fim, o óleo é filtrado para remover a argila. A porção de argila adicionada depende do tipo de óleo a clarificar e do poder descolorante da argila. O objetivo desta etapa é a eliminação dos pigmentos que conferem cor ao óleo tornando-o mais claro. Na desodorização, etapa final de ambos os processos, são removidas as substâncias que conferem sabores desagradáveis aos óleos, como cetonas, aldeídos, álcoois e ácidos gordos livres. Porém, a eficiência desta etapa depende em muito das etapas anteriores, pois, caso tenha ocorrido alguma lacuna, dificilmente será corrigida na totalidade nesta fase. A desodorização é realizada em vácuo (3-7 mbar), com uma temperatura entre os 240°C e os 270°C e o tempo de permanência do óleo no desodorizador varia entre os 15 e os 80 minutos ²³⁻²⁵. Os processos de refinação físico e químico encontram-se sintetizados nas figuras 4 e 5, respetivamente.

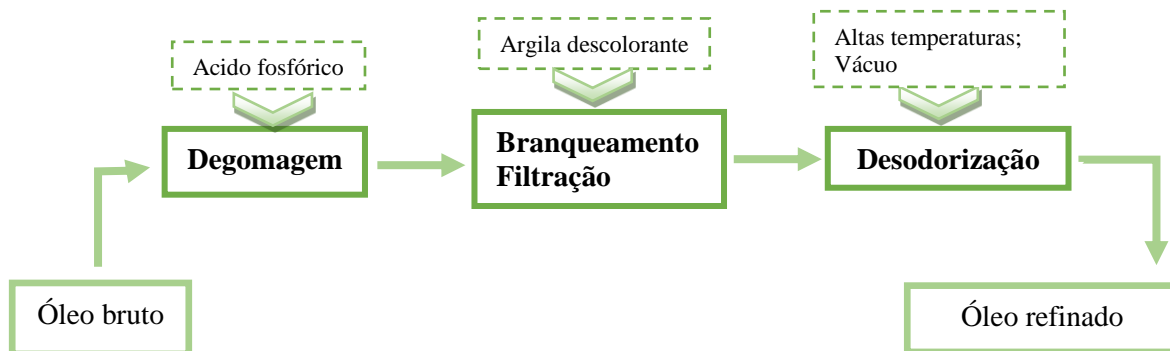


Figura 4: Etapas da refinação física dos óleos vegetais, adaptado de ²⁶.

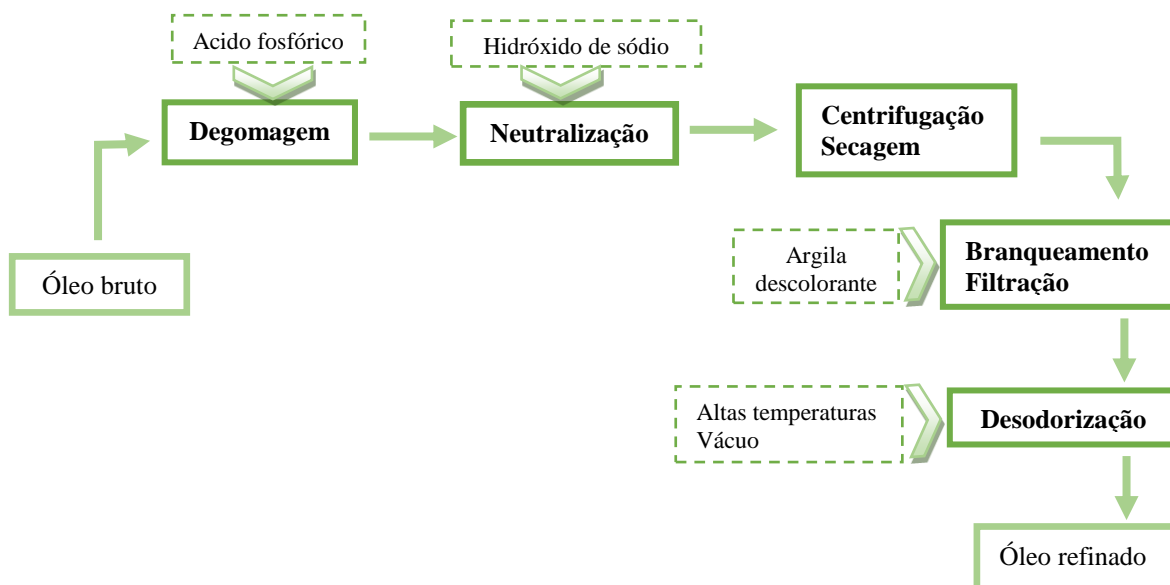


Figura 5: Etapas da refinação química dos óleos vegetais, adaptado de ²⁶.

Durante a refinação dos óleos vegetais podem ocorrer alterações químicas indesejáveis. A ocorrência da formação de ésteres de 3-MCPD e de ésteres glicidílicos é das alterações que mais atenção tem recebido. Estes são contaminantes induzidos pelo calor, levando a que a etapa da desodorização seja a fase mais preocupante, pois são atingidas elevadas temperaturas tornando o ambiente propício à sua formação ²⁷. Dos diferentes tipos de óleos vegetais, o óleo de palma é aquele que apresenta maiores concentrações de ésteres de 3-MCPD depois de refinado, como é possível verificar na Figura 6 ⁷.



Figura 6: Níveis de GE e 3-MCPD nos diferentes tipos de óleos e gorduras em µg/kg, recolhidos de 2012 a 2015¹⁸.

Relativamente ao óleo de palma, acredita-se que os altos níveis de 3-MCPDE são, em muito, influenciados pela sua composição. Contudo, é também a sua composição que faz deste o óleo mais usado na indústria alimentar, cerca de 90%. O óleo de palma contém uma elevada proporção de ácido palmítico e quantidades consideráveis de ácidos oleico e linoleico, conferindo-lhe um maior teor de ácidos gordos insaturados do que o óleo de coco e de amêndoa, por exemplo. O óleo de palma contém 50% de ácidos gordos saturados, 40% de ácidos gordos monoinsaturados e 10% de ácidos gordos poliinsaturados. Este óleo possui importantes características que determinam a sua incorporação em produtos alimentares. Estas características incluem: um elevado teor de glicerídeos sólidos conferindo a consistência necessária sem hidrogenação; resistência à oxidação e, portanto, maior tempo de validade; triglicerídeos de um elevado ponto de fusão e com teor de sólidos relativamente baixo a 10° C; um preço competitivo; entre outras. O óleo de palma pode ser fracionado em duas principais frações: uma fração líquida, a oleína de palma e uma fração sólida, a estearina. A oleína de palma é mais insaturada e o seu processo de deterioração é mais lento do que muitos outros óleos vegetais, como óleo de girassol e óleo de soja. O óleo de palma bruto e a óleo de palma refinado têm boa estabilidade oxidativa devido à presença de antioxidantes naturais (tocoferol e tocotrienóis). Na sua composição química apresenta o

ácido láurico, o ácido mirístico, o ácido palmítico, o ácido esteárico, o ácido oleico, o ácido linoleico, o ácido linolénico, o ácido araquídico, entre outros ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. É constituído também por tocoferóis, carotenoides (alfa e beta carotenos), esteróis (beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol), taninos, flavonóides, terpenóides, álcoois alifáticos, hidrocarbonetos, cetonas, ésteres de cera e ésteres metílicos²¹.

1.3.4 Catalisadores da formação nos óleos vegetais

A formação de 3-MCPDE segue mecanismos complexos nos quais não interferem apenas as condições do processo, como a temperatura, o tempo e o pH, mas a presença de precursores desempenha também um importante papel²⁸.

Estudos realizados pela *Malaysian Palm Oil Board* (MPOB), principal agência governamental da Malásia encarregue de servir a indústria de óleo de palma do país, revelaram que, para além do tempo e temperatura da etapa de desodorização, existem outros fatores possíveis, ligados à refinação dos óleos vegetais, que contribuem para a formação de 3-MCPDE. Incluem-se nestes a acidez, ou seja, a quantidade de ácido fosfórico adicionado; o tipo de argila descolorante e os níveis do ião cloreto²⁹.

Na literatura, são citados como principais catalisadores da formação de ésteres de 3-MCPD os precursores lipídicos e a presença do ião cloreto. Os altos níveis de 3-MCPDE encontrados em óleos obtidos a partir de frutos levaram a que surgissem as primeiras dúvidas de que os principais precursores lipídicos da reação de formação seriam os diacilgliceróis (DAGs). Contudo, ao tentar relacionar os níveis de DAGs e de 3-MCPDE foram obtidos resultados incongruentes. Posto isto, foram efetuados estudos em sistemas modelos simulando o processo de desodorização de óleo de palma. Estes estudos exibiram uma interação entre os DAGs e os iões cloreto resultando na formação de 3-MCPDE, no entanto, esta não aparenta ser a via preponderante da reação. O óleo de palma, na sua composição detém cerca de 0,2-0,35% de MAGs, 4-12% de DAGs e 88-95% de triacilgliceróis (TAGs). Visto que os acilgliceróis parciais, MAGs e DAGs, resultam da degradação dos TAGs através de ação enzimática, a sua quantidade no óleo está diretamente relacionada com o tempo que decorre entre a colheita dos frutos e seu processamento. Estudos realizados

mostraram que os TAGs, a temperaturas acima dos 150° C, seriam os substratos mais reativos na formação de diésteres de 3-MCPD e que, tanto os TAGs como os diésteres de 3-MCPD aparecem em quantidades superiores nos óleos. Assim, estes dois fatores levaram a que se aceitasse que seria esta a principal via de formação dos 3-MCPDE. Relativamente ao ião cloreto, as principais hipóteses seriam de que a sua fonte fosse o próprio óleo ou o vapor utilizado na etapa de desodorização. Investigações iniciais acerca do teor de cloreto presente nos óleos e no vapor não identificaram associação com a formação de ésteres de 3-MCPD. Contudo, posteriores evidências identificaram a presença de várias espécies de cloro orgânico e inorgânico ligadas covalentemente no óleo de palma bruto. Estas espécies podem ser emergentes do metabolismo endógeno da planta e/ou da contaminação ambiental. Além disto, ensaios *in vitro* mostraram uma elevada correlação entre a decomposição térmica de compostos clorados, tanto orgânicos como inorgânicos, e a formação de diésteres de 3-MCPD. Adicionalmente, estes ensaios mostraram também que a degradação destes compostos gera ácido clorídrico que poderá ser também uma fonte do ião cloreto envolvido na reação ^{7,12}.

1.3.5 Formação de 3-MCPDE e GE nos alimentos

A formação de ésteres de 3-MCPD é explicada por um mecanismo em que ocorre a quebra de compostos de cloro orgânico em substâncias cloradas reativas, como ácido clorídrico. A formação dá-se, então, através da protonação do grupo éster terminal dos TAGs com interação do ácido clorídrico. O catião oxónio formado sofre rearranjo intramolecular, seguido por substituição nucleofílica do ião cloreto e libertação de ácido gordo livre e de um diéster de MCPD. As temperaturas apresentam aqui um papel bastante importante. A temperaturas superiores a 120° C, começa a ocorrer o processo de decomposição de compostos orgânicos clorados e, a temperaturas acima de 150° C, ocorre, na estrutura do glicerol, a substituição dum ácido gordo por um átomo de cloro ²⁸. Nos óleos vegetais, a formação de ésteres de 3-MCPD está associada ao processo de refinação onde ocorre a remoção de impurezas que podem alterar as características químicas e organoléticas destes. No processo de refinação, a etapa de desodorização atinge temperaturas acima de 200° C levando à formação de 3-MCPDE pelo mecanismo supra descrito. Nos alimentos fritos ou ricos em gordura, o uso de um óleo já contaminado no processo de fritura ou na formulação

dos produtos, explica a presença de ésteres de 3-MCPD. Ainda assim, a formação de 3-MCPDE pode ser considerável em alimentos que apresentem na sua composição potenciais precursores e que, durante o seu processamento, sejam sujeitos a altas temperaturas. Nos alimentos processados, a formação de 3-MCPDE é descrita por uma reação entre os lípidos e o cloreto de sódio. Estudos realizados, utilizando sistemas modelo aquecidos a 100° C, durante 30 minutos, concluíram que a formação de 3-MCPDE assume um comportamento diretamente proporcional à concentração de lípidos e de sal presentes nos alimentos. Concluíram ainda que as amostras com 20% de água e as amostras aquecidas a altas temperaturas por longos períodos de tempo apresentavam concentrações maiores do composto. Por fim, os investigadores observaram que aumentando a temperatura de 100° C para 230° C ocorre, simultaneamente, a formação e a decomposição do composto. O leite materno é o único alimento, até agora, contaminado naturalmente com 3-MCPDE. Acredita-se que neste a contaminação apareça por alimentos consumidos que já se encontram contaminados. No processo ocorre absorção direta dos 3-MCPDE ou absorção dos monoésteres resultantes da hidrólise de diésteres de 3-MCPD, sendo posteriormente depositados nas glândulas mamárias ^{15,18,30}.

Os ésteres de glicidílicos formam-se quando os óleos vegetais são aquecidos a temperaturas superiores a 200° C a partir de substâncias naturalmente presentes nestes, os chamados diacilgliceróis. A formação de GE a partir de DAGs através de um rearranjo intramolecular e, posterior, eliminação de um ácido gordo. Este aquecimento ocorre normalmente na etapa de desodorização dos óleos durante a refinação e é um problema particular no óleo de palma, pois este apresenta um teor elevado de diacilgliceróis, cerca de 4 a 12%. Diversos estudos concluíram que há um aumento exponencial da formação de GE com temperaturas a partir de 230-240° C e com um nível de diglicerídeos superior a 4%. Os GE formam-se como resultado do tratamento térmico e o mecanismo da reação envolve um rearranjo intramolecular com posterior libertação de um ácido gordo e formação de uma ligação epóxido ^{18,28,31}.

1.3.6 Possíveis formas de minimizar

É do interesse de todos, autoridades e produtores, que os níveis de 3-MCPDE e GE sejam reduzidos para que não cheguem alimentos prejudiciais aos consumidores. São já conhecidos

os fatores do processo de refinação que maioritariamente contribuem para altas formações de 3-MCPDE. Verificou-se que a utilização de uma incorreta dosagem do ácido fosfórico na etapa de degomagem, o uso de argilas com pH elevado na etapa de branqueamento e as elevadas temperaturas de desodorização, principal fator que causa a reação dos cloretos com os acilgliceróis, aparentam ser as causas que mais contribuem¹⁶. Com o objetivo de diminuir teores de 3-MCPDE e, tendo em conta estes fatores, existem já algumas medidas simples que podem ser tomadas por parte dos produtores de óleos vegetais. Assim, recomenda-se que as frutas, após colheita, sejam imediatamente esterilizadas para reduzir tanto os fosfolípidos como os ácidos gordos livres facilitando as etapas de degomagem e desodorização; recomenda-se, também, o uso de um óleo bruto de boa qualidade para a refinação; na etapa de refinação aconselha-se o uso de argila natural ou argila ativada por ácido com pH neutro ou próximo deste; na etapa de degomagem utilizar apenas níveis suficientes de ácido fosfórico que garantam a eficácia desta etapa; reduzir ao máximo a acidez antes do branqueamento; a realização da refinação química é, também, uma forma possível de redução de ésteres de 3-MCPD^{12,29}.

Para além das medidas mencionadas, existem também estudos realizados que tentam criar estratégias para reduzir a quantidade de ésteres de 3-MCPD. Estes estudos têm como foco principal a redução da contaminação de óleos e gorduras, especialmente no óleo de palma. As investigações prendem-se, de uma forma geral, com três estratégias independentes: a remoção dos possíveis precursores; alterações nos parâmetros do processamento e degradação ou eliminação dos compostos do produto final. Em relação à remoção dos potenciais precursores, estratégias, como a adição de duas etapas de lavagem, mostram resultados promissores na redução do composto. A lavagem do óleo bruto com uma solução aquosa contendo etanol antes da desodorização permite uma remoção dos compostos clorados orgânicos e, conseqüente redução de aproximadamente 30% dos 3-MCPDE e a lavagem da polpa da fruta da palma antes da extração do óleo consegue uma redução de aproximadamente 95% de diésteres de 3-MCPD. Considerando a etapa de desodorização, sabe-se que possíveis modificações no perfil de tempo/temperatura não apresentam resultados esperados. Além disso, investigadores mostraram que os níveis de ésteres de 3-MCPD em óleo de palma refinado são independentes das condições de desodorização, pois a formação destes compostos pode ocorrer com temperaturas de 200° C, inclusive. Não podendo alterar tempos e temperaturas desta etapa, os investigadores analisaram outras

formas para a minimização. Verificaram, então, que antes da desodorização, se for adicionada uma solução de 1% de glicerol ou etanol ao óleo, conseguem-se reduções de 25 a 35%, aproximadamente. No que toca à degradação ou eliminação dos compostos do produto final, foi estudada a possibilidade de remoção enzimática de 3-MCPDE. Em sistemas modelo e utilizando a enzima lipase da levedura *Cândida antarctica*, verificou-se a transformação de 3-MCPDE em 3-MCPD e posterior conversão a glicerol pela ação de diferentes enzimas. Contudo, esta estratégia depende em muito da eficiência do processo de desodorização ^{7,12,32}.

Relativamente à redução dos teores de GE, esta passa essencialmente por reduzir ao máximo aqueles que são considerados os seus precursores presentes nos óleos. Os principais percursos dos GE são os ácidos gordos livres (FFA), os DAG's e a temperatura. Ao minimizar as reações hidrolíticas que ocorrem; reduzir os níveis de DAGs; remover os FFA durante a neutralização, que leva a que as temperaturas de desodorização sejam reduzidas também, são observados efeitos consideráveis na redução de GE ³³.

Nas figuras seguintes (Figura 7 e Figura 8), é possível verificar que desde 2010 até 2015, os teores de 3-MCPDE e de GE no óleo de palma, bem como nos outros tipos de óleos, têm vindo a diminuir em consequência das medidas tomadas.

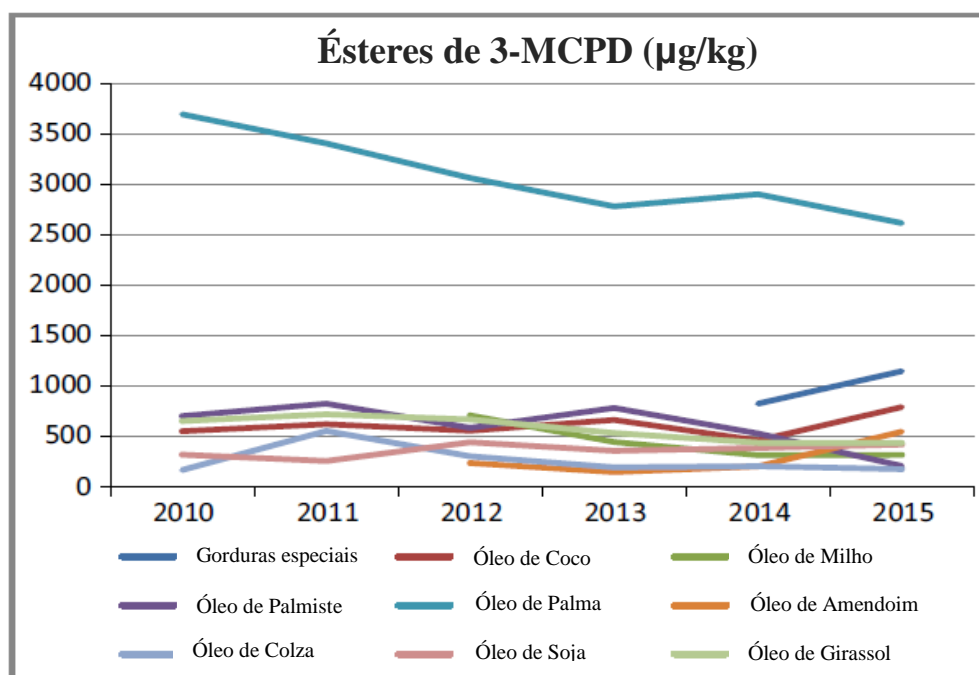


Figura 7: Evolução desde 2011 a 2015 de 3-MCPDE nos diferentes tipos de óleos ¹².

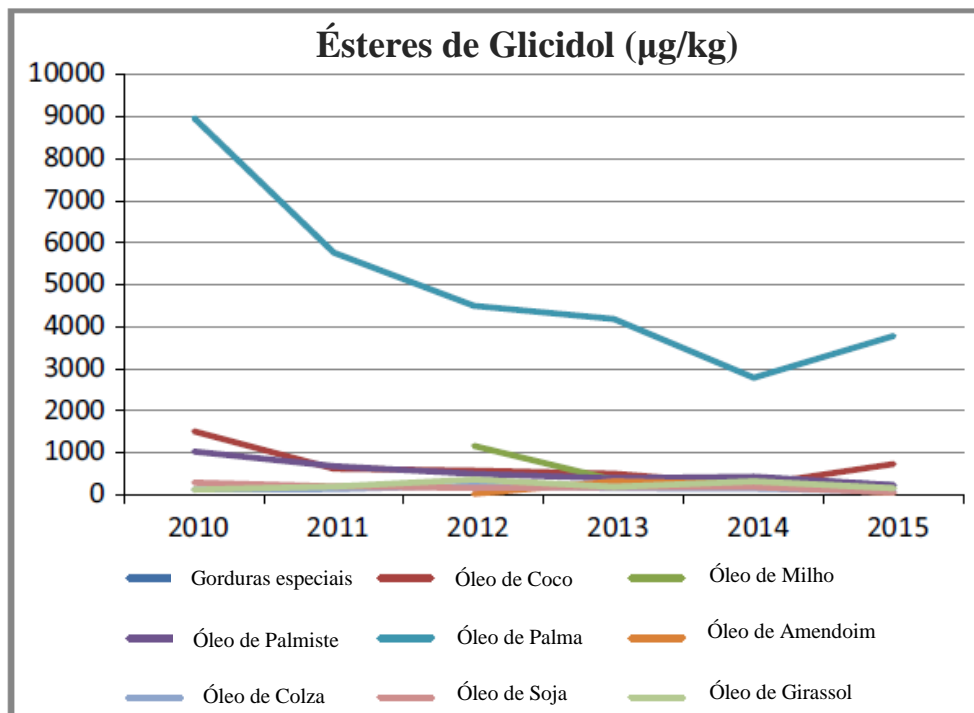


Figura 8: Evolução desde 2011 a 2015 de GE nos diferentes tipos de óleos ¹².

Além das medidas preventivas mencionadas em cima, existem também patentes com o objetivo de minimizar os níveis de 3-MCPDE no óleo de palma.

A Nestlé, possui três patentes que visam a limpeza dos extratos da matéria prima levando a uma diminuição nos valores do contaminante no óleo refinado. Uma das patentes intitula-se “*Producing refined plant oils from washed crude plant oil*” (EP2502500 B1)³⁴ e tem como principal objetivo evitar a produção de 3-MCPDE durante a refinação dos óleos. A diminuição dos níveis de 3-MCPDE é conseguida removendo os dadores de cloro do óleo antes de este ser refinado. Assim, o óleo bruto é sujeito a uma extração líquido-líquido com um solvente polar. Este solvente pode ser um álcool, como por exemplo o etanol ou o 2-propanol, em combinação com água. As condições ótimas deste processo são uma temperatura entre 40° C a 80° C, durante 1-5 minutos, com uma agitação constante e repetido várias vezes. A solução contendo o solvente polar deve ser extraída logo que possível por centrifugação. A partir do momento que os potenciais dadores de cloro são removidos, não existirão mais fontes disponíveis deste, levando a que não haja produção de 3-MCPDE

durante a refinação. Os óleos vegetais refinados produzidos a partir de óleo bruto extraído por este processo apresentam entre 0,3-1ppm de 3-MCPDE ³⁴.

Além desta, a Nestlé tem também a patente denominada por “*Refined plant oils free of glycidyl esters*” (**EP2502499 B1**) ²⁶. Nesta foi realizado um estudo com o intuito de relacionar diretamente o nível de ácidos gordos livres no óleo de palma bruto com o conteúdo de DAGs no óleo de palma refinado. Neste estudo utilizou-se um óleo de semente de algodão com baixo teor de DGAs (< 1%) como meio de reação e foi adicionado ácido diheptadecanóico (C17:0) em várias quantidades, variando de 1-5% de óleo total. As misturas foram aquecidas em ampolas separadas a 235° C durante duas horas. Ao analisar os resultados, os investigadores observaram que a formação de GE a partir de DAGs não é diretamente proporcional ao seu conteúdo, pois abaixo de 3% de DAG a formação de GE consegue ser controlada. Conseguiram também relacionar o nível de FFA no óleo de palma bruto com o conteúdo de DAG de óleo de palma totalmente refinado, ou seja, 3% de DAGs em óleo de palma refinado equivale a 1,2-1,3% de FFA no óleo bruto. Além disso, foi notável que baixos teores de FFA no óleo bruto implicam, posteriormente, baixos teores de GE no óleo refinado. Através de todas estas conclusões, foi-lhes possível estabelecer características preferenciais para o óleo. Assim, a fruta deve ser colhida e utilizada, no máximo, até 24 horas após a colheita; o óleo bruto deve apresentar um peso máximo de 1,3-2% de FFA e um teor máximo de 3-3.5% de DAGs antes de desodorização ²⁶.

Por fim, a última patente designa-se por “*Plant for cleaning bins used for vegetable produce*” (**EP2501501 A1**)³⁵. O objetivo desta é ligeiramente diferente do das supra descritas. Nesta é descrito um processo de lavagem para as caixas usadas na recolha e transporte dos produtos vegetais. Este estudo foi desenvolvido devido à presença de variações no grau de sujidade dos recipientes de colheita, por isso, torna-se vantajoso e apropriado a realização de uma lavagem diferenciada de acordo com o diferente grau de sujidade. Neste processo, existe uma estação de medição e controlo que deteta e mede o nível de sujidade presente em cada uma das caixas, modificando o modo de lavagem de acordo com o nível de sujidade detetado para cada uma delas ³⁵.

Investigadores do departamento de Biotecnologia e Catálise de Enzimas, do Instituto de Bioquímica, da Universidade de *Greifswald* na Alemanha, realizaram um estudo sobre a

remoção de 3-MCPD e dos seus ésteres através de enzimas, patenteando-o como “*Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its esters from oils*” (DE102009042760A1)¹⁴. Neste estudo, descreve-se a primeira abordagem enzimática para remoção de 3-MCPD e dos seus ésteres em sistemas aquosos e bifásicos, convertendo-os em glicerol. Inicialmente, o 3-MCPD foi convertido num sistema aquoso por uma cascata de enzimas e, depois, convertido em glicerol. De seguida, os 3-MCPDE foram convertidos num sistema bifásico, também através de uma cascata de enzimas, e, após isto, em glicerol¹⁴. Atualmente, a presença de 3-MCPD nos óleos refinados é cuidadosamente monitorizada e os óleos com um teor de 3-MCPD acima do limite são descartados para garantir a total conformidade da EFSA³⁴.

1.3.7 Metabolismo no organismo humano

Em 2007, uma pesquisa do Comité Misto (FAO) / (OMS) de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA)³⁶ resumiu o conteúdo de 3-MCPD em vários alimentos consumidos por adultos e crianças por quilograma de peso corporal em relação às estimativas de exposição. As exposições dietéticas médias variaram de 0,02 a 0,7 mg/kg de peso corporal para uma vasta gama de alimentos, incluindo molho de soja e alimentos relacionados, nos quais a concentração média de 3-MCPD foi a mais elevada (8 mg/kg). As exposições estimadas para crianças pequenas, que constituem a maior percentagem entre outros grupos de consumidores, variaram de 0,06 a 2,3 mg/kg peso corporal²⁰.

Diversos estudos têm avaliado a ingestão de 3-MCPD a partir dos seus ésteres, observando a hidrólise completa destes compostos. Recentemente, estudos conduzidos com sistemas gastrointestinais modelo, demonstraram que os ésteres glicídicos podem ser substratos de lipases e, conseqüentemente, liberar glicidol durante a digestão, contudo esta etapa parece depender diretamente do pH do meio⁷. Assim, assume-se que, tanto o 3-MCPDE como o GE são completamente degradados no processo digestivo, gerando 3-MCPD e glicidol, respetivamente. Esta é, então, a razão destes serem avaliados toxicologicamente como formas livres³⁰. Muitos foram os estudos realizados com o objetivo de compreender os efeitos críticos do 3-MCPD e, através destes, foi possível definir os efeitos prejudiciais do composto bem como a dose diária admissível (DDA).

1.3.8 Perigos para a saúde humana

Como referido anteriormente, diversos são os estudos feitos e os pareceres científicos divulgados acerca dos perigos do 3-MCPD e 3-MCPDE e do glicidol e GE na saúde humana. Relativamente ao 3-MCPD, em 1994, foi feito, pelo Comité Científico da Alimentação Humana (SCF) da Comissão Europeia, um estudo de carcinogenicidade a longo prazo em ratos; em 2001, também pelo SCF, o 3-MCPD foi classificado; em 2004 o JECFA realizou uma avaliação de risco sobre a presença de 3-MCPD em alimentos; em 2007, o Instituto Federal de Avaliação de Riscos (BfR) deu o seu parecer sobre a toxicidade e biodisponibilidade de ésteres de 3-MCPD; em 2008, o Painel CONTAM, a pedido da CE, divulgou uma declaração acerca da presença de 3-MCPD em alimentos e confirmou a avaliação dada pela BfR; em 2012, o BfR fez uma revisão ao seu parecer dado em 2007 e estabeleceu uma DDA de 2 µg/kg de peso corporal; em 2013, a Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC), declarou que não havia evidências que sugerissem que o 3-MCPD não seria genotóxico. Dos estudos e opiniões divulgados ao longo destes anos, foi possível melhorar o conhecimento acerca do 3-MCPD e os seus efeitos. Sabe-se agora que os mecanismos genotóxicos deste composto resultam num aumento de tumores benignos em ratos; induz, nos mesmos, neoplasia por um mecanismo que não envolve danos no DNA; é necessária uma exposição acima do limiar, isto é, não ocorrem efeitos abaixo de uma certa dose; concentrações médias/altas consumidas num curto período de tempo causam hiperplasia e tumores nos rins e órgãos reprodutivos; não apresenta efeitos mutagénicos; foi classificado como cancerígeno do Grupo 2B, ou seja, existem algumas evidências de que é um possível cancerígeno para os seres humanos, e como Proposição 65 que se refere a uma substância que pode causar cancro, defeitos congénitos e outros danos reprodutivos. Até hoje, não foram realizados estudos em humanos, todas as conclusões acima referidas advêm de estudos realizados em ratos e camundongos ^{10,12,30}.

Como referido anteriormente e, segundo a recomendação do Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios ³⁷, a dose diária admissível é de 2 µg/kg de peso corporal para o 3-MCPD. Este regulamento apenas fixa teores máximos obrigatórios de 20 µg/kg de 3-MCPD nas proteínas vegetais hidrolisadas e em molhos de soja. Relativamente à DDA, a CE solicitou um novo parecer científico sobre os riscos para a saúde

humana relacionados com a presença deste contaminante ao Painel sobre Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM Panel) da EFSA. Assim em março de 2016 a CONTAM Panel estabeleceu uma DDA de 0,8 µg/kg de peso corporal para o 3-MCPD ^{12,15}.

Em relação ao glicidol, este foi classificado pelo IARC como cancerígeno do grupo 2A, isto é, existem fortes evidências de que é um provável cancerígeno para os seres humanos. O BfR conclui que os níveis de exposição de lactentes e adultos representam um perigo para a saúde humana devido às propriedades genotóxicas e carcinogénicas do glicidol e ao metabolismo hidrolítico para glicidol biodisponível. Posto isto, o mesmo recomendou que os níveis de GE em óleos vegetais deveriam ser reduzidos tanto quanto possível de acordo com o princípio de ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*). Testes de carcinogenicidade mostraram um aumento da incidência de tumores em ratos e camundongos quando expostos ao glicidol ^{12,30}.

1.3.9 Métodos de análise

Vários investigadores e organizações têm vindo a desenvolver métodos de análise para ésteres de 3-MCPD e GE a fim de se conseguir uma quantificação rápida e fácil, para que os limites sejam cumpridos. Contudo, não são estabelecidos métodos específicos para a determinação deste contaminante, mas existem critérios de desempenho que devem ser seguidos. Exemplos destes critérios são o limite de deteção (LOD)¹ e o limite de quantificação (LOQ)² de 5 e 10 µg/kg, respetivamente, em relação à matéria seca ³⁸.

A análise destes contaminantes é extremamente complexa e identificam-se sobretudo métodos diretos e indiretos.

Os métodos diretos permitem identificar individualmente os 3-MCPDE. Normalmente, estes métodos são antecidos de extração em fase sólida e a determinação de 3-MCPD é depois realizada utilizando métodos de cromatografia gasosa acoplada a detetor de espectrometria de massa (GC-MS). Porém, têm também sido divulgados métodos de cromatografia líquida

¹ **Limite de deteção:** limite de deteção, teor mínimo medido a partir do qual é possível deduzir a presença do analito com uma certeza estatística razoável. O limite de deteção é numericamente igual a três vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco ($n > 20$) ⁴⁹.

² **Limite de quantificação:** limite de quantificação, teor mais baixo do analito que é possível medir com uma certeza estatística razoável. Se a exatidão e a precisão forem constantes numa gama de concentrações centrada no limite de deteção, o limite de quantificação é numericamente igual a 10 vezes o desvio-padrão da média de ensaios em branco ($n \geq 20$) ⁴⁹.

de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS). Por sua vez, nos métodos indiretos, a concentração total dos ésteres de 3-MCPD é medida como 3-MCPD e compreende a adição de padrão interno, hidrólise, neutralização, remoção de ésteres metílicos de ácidos gordos, derivatização do 3-MCPD e, por último, análise por GC-MS.

Na determinação indireta, os 3-MCPDE presentes na amostra são analisados sob a forma livre de 3-MCPD sendo, para isso, necessária a realização da conversão dos ésteres. Inicialmente, é adicionado um padrão interno à amostra. De seguida, inicia-se a conversão de 3-MCPDE em 3-MCPD através da reação de transesterificação catalisada por um ácido ou uma base. De acordo com alguns investigadores, a libertação de 3-MCPD, quando é realizada a transesterificação ácida, usando uma solução de ácido sulfúrico em metanol, ocorre em 16 horas. É, ainda, realizada a neutralização utilizando o bicarbonato de sódio e a remoção dos ésteres metílicos de ácidos gordos por salting-out, usando o cloreto de sódio. Por fim, é feita a derivatização do 3-MCPD, usando ácido fenilborónico ou heptafluorobutirilimidazol. A realização desta etapa justifica-se pela baixa volatilidade e alta polaridade do 3-MCPD conseguindo-se, assim, um aumento da volatilidade e da sensibilidade do composto. Por fim, é analisada, por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). A análise indireta faz uso apenas de um pequeno número de padrões analíticos, o que a torna vantajosa. No entanto, apresenta desvantagens como a impossibilidade de identificar o tipo de ésteres presentes; a necessidade de inúmeras etapas para a preparação da amostra, tornando-se um procedimento longo e suscetível a erros, e o elevado tempo necessário para a transesterificação. A fim de contornar estas desvantagens, têm sido propostas diversas modificações a este procedimento. Assim, novas investigações sugeriram a transesterificação catalisada por uma base. Neste procedimento, o 3-MCPD é separado dos ésteres em apenas 10 minutos usando uma solução de metóxido de sódio e metanol. As etapas de neutralização e salting-out são realizadas com soluções de ácido acético glacial e cloreto de sódio, respetivamente. O método foi validado e adotado pela Sociedade Alemã de Pesquisa de Óleos e Gorduras como DGF C-III 18 (09) ³⁹. Este método apresenta, como principal vantagem, uma significativa redução do tempo de transesterificação. Com o intuito de contornar a suscetibilidade a erros dos métodos diretos foram realizados dois ensaios utilizando o óleo de palma refinado como amostra ^{39,40}. Nestes ensaios, foram notórias algumas discrepâncias nos resultados obtidos dos métodos com recurso à transesterificação ácida e com recurso à transesterificação alcalina. Os

procedimentos baseados na transesterificação ácida obtiveram resultados satisfatórios, contudo o mesmo não aconteceu com os resultados dos procedimentos baseados em transesterificação alcalina. Estas diferenças foram justificadas com a presença de GE nos óleos refinados. Em condições alcalinas, os GE podem ser hidrolisados em glicidol o que, consequentemente, leva à formação de 3-MCPD, na presença de cloreto. Por esta razão, os resultados das análises não mostram os valores reais de 3-MCPD. Assim, este método sofreu diversas modificações com o objetivo de o otimizar. Entre elas, destacam-se a realização de um pré-tratamento, antes da transesterificação, com solução de ácido sulfúrico em propanol para que os GE sejam destruídos e a utilização de cloreto na fase do salting-out. Existem ainda os métodos baseados na hidrólise enzimática dos ésteres de 3-MCPD como alternativa aos procedimentos que utilizam a transesterificação ácida. Neste método, foi avaliada a utilização da lipase obtidas de culturas de *Aspergillus oryzae*, *Candida rugosa* e *Candida antarctica*. A principal vantagem além da redução do tempo de análise, prende-se com a manutenção da integridade das moléculas, visto que, em condições de hidrólise não ocorre a interconversão entre o 3-MCPD e o glicidol. Antes da etapa de derivatização, é possível adicionar iões de brometo, levando à formação de 3-MBPD a partir do glicidol impedindo a reação de formação de 3-MCPD com os iões cloreto. De forma a contornar uma outra desvantagem dos métodos indiretos, o facto de não ser possível obter informações acerca da natureza dos compostos individuais, investigadores propuseram a separação de monoésteres e de diésteres. Esta separação é feita por extração em fase sólida (SPE) antes da etapa de transesterificação possibilitando, deste modo, a identificação e quantificação das frações totais de cada espécie ^{38,40}.

A determinação direta de 3-MCPDE fundamenta-se em métodos de preparação de amostras bem estabelecidos e fornece esclarecimentos diretos sobre os 3-MCPDE presentes nas amostras analisadas. O elevado número de possíveis mono- e diésteres de 3-MCPD, diretamente relacionados com o número de diferentes ácidos gordos presentes na amostra, requer uma seletividade nos métodos de separação e deteção. Estes métodos requerem uma preparação prévia da amostra com o intuito de remover as interferências e adicionar padrões internos e, posterior, determinação de um número variável de mono- e diésteres através de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS) ^{38,40}. Dos dois métodos descritos, os métodos indiretos são mais utilizados que os métodos diretos ⁴⁰.

Assim como para os ésteres de 3-MCPD, métodos diretos e indiretos têm sido propostos para a determinação de ésteres glicídicos. Nos métodos indiretos, a análise parece ser simples, passando pela diluição da amostra num solvente apropriado ou extração em fase sólida e posterior análise por HPLC-MS. Em relação aos métodos indiretos, existem duas vias alternativas para a análise. O primeiro procedimento passa pela transesterificação alcalina, utilizando duas análises independentes, uma que determina a soma de 3-MCPDE e de GE utilizando cloreto de sódio para o salting-out, e outra que determina apenas os 3-MCPDE, através da destruição dos GE, aplicando um pré-tratamento ácido. A diferença entre as duas análises permite o cálculo da concentração total dos compostos. Diversas críticas têm sido feitas a este procedimento devido à possível conversão bidirecional entre 3-MCPD e glicidol durante a análise. A segunda alternativa baseia-se na conversão dos ésteres glicídicos noutras espécies, como monoésteres de 3-monobromopropano-1,2-diol ou 3-metoxipropano-1,2-diol, antes da etapa de transesterificação. Os métodos de análise para a determinação de GE não foram ainda avaliados em ensaios de proficiência e, os estudos que comparem os procedimentos diretos e indiretos realizados, têm mostrado resultados limitados e controversos, revelando uma vez mais o impacto da técnica analítica indireta utilizada ^{7,40}.

1.3.10 Legislação mundial

A legislação do 3-MCPD varia conforme o país e, até à data, existe apenas limite legal obrigatório nos molhos de soja e na HPV. Na União Europeia, para ambos, o limite é de 0,02 mg/kg. Na Nova Zelândia, no Canadá e na Suíça é de 0,2 mg/kg, 1 mg/kg e 0,2 mg/kg nos molhos de soja, respetivamente. Na República da China, na Coreia do Sul, na Tailândia e nos Estados Unidos da América é de 1 mg/kg em HPV ²¹.

No final do ano de 2017, era esperada uma alteração na legislação relativa a 3-MCPD, 3-MCPDE e GE de forma a ser alargada a dois tipos de produtos, aos óleos e gorduras vegetais e aos alimentos para bebés e crianças. A definição de teor máximo de 3-MCPD, 3-MCPDE e GE em óleos e gorduras vegetais foi considerada apropriada uma vez que este é o grupo de alimentos que apresenta os valores mais elevados deste contaminante. Assim, foram sugeridos teores máximos de 2,0 mg/Kg para 3-MCPD e 3-MCPDE e de 1,0mg/Kg para GE,

a serem aplicados a partir de setembro de 2017. Os valores propostos foram aceites pela indústria dos óleos e gorduras vegetais, porém existe a preocupação quanto à viabilidade destes níveis máximos sem que haja alterações a outros parâmetros de segurança e qualidade. Considerando as preocupações ao nível da saúde, manifestadas pela EFSA para lactentes e crianças pequenas, torna-se também apropriado estabelecer teores máximos para 3-MCPD e GE. Os valores variam conforme o estado físico dos alimentos. Assim, para alimentos em pó para lactentes e crianças foram propostos teores máximos de 0,125 mg/Kg para 3-MCPD e 3-MCPDE e de 0,075 mg/Kg para GE. Já para alimentos líquidos para lactentes e crianças foram propostos teores máximos de 0,015 mg/Kg para 3-MCPD e 3-MCPDE e de 0,010 mg/Kg para GE. Na tabela em baixo, Tabela 1, encontram-se os valores máximos propostos para os dois tipos de alimentos.

Tabela 1: Legislação relativa a 3-MCPD, 3-MCPDE e GE. a entrar em vigor até 2018

Tipos de alimentos	3-MCPD e 3-MCPDE (mg/Kg)	GE (mg/Kg)
Óleos e Gorduras vegetais	2,0	1,0
Alimentos para lactentes e crianças - em pó	0,125	0,075
Alimentos para lactentes e crianças - líquidos	0,015	0,010

No entanto, a Comissão Conjunta de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes das Nações Unidas / Organização Mundial da Saúde (JECFA) avaliou os riscos para a saúde pública de 3-MCPD, 3-MCPDE e GE, com conclusões divergentes da EFSA, em particular no que diz respeito aos 3-MCPDE. No seguimento destas conclusões, a EFSA decidiu não reabrir a sua opinião científica relativamente aos GE e, foram discutidas propostas de regulamento da União Europeia (EU) que estabelecesse teores máximos para a presença de GE em óleos vegetais e produtos alimentares que contenham os mesmos de forma a assegurar um elevado nível de proteção da saúde humana, em particular dos lactentes e crianças jovens. Posto isto, foram discutidos teores máximos para óleos e gorduras vegetais; teores máximos mais apertados para óleos vegetais usados para a produção de alimentos para bebés e alimentos transformados à base de cereais para lactentes e crianças jovens; e, teores máximos mais apertados para fórmulas para lactentes e fórmulas de transição e alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, particularmente destinados a lactentes e crianças jovens (pó e líquido). A entrada em vigor dos teores

máximos a estipular limites tem um período transitório. Na tabela em baixo (tabela 2) figuram os teores máximos para GE.

Tabela 2: Teores máximos para GE a entrar em vigor em 2019

Tipos de alimentos	GE (mg/Kg)
Óleos e Gorduras vegetais	1,0
Óleos vegetais (produção de alimentos para bebés e alimentos transformados à base de cereais para lactentes e crianças jovens)	0,5
Alimentos para lactentes - em pó	0,050
Alimentos para lactentes - líquidos	0,010

Relativamente ao 3-MCPD e 3-MCPDE, a EFSA decidiu reabrir/reavaliar a sua opinião científica, motivo pelo qual medidas regulatórias para o estabelecimento de teores máximos destes contaminantes em óleos vegetais e produtos que contenham óleos vegetais tomarão apenas lugar após fecho de nova opinião científica ⁴¹.

Capítulo II – Estudo e compreensão do composto 3-MCPD e dos seus ésteres

2.1 Introdução

No âmbito do estágio curricular surgiu a necessidade de estudar e compreender o contaminante 3-MCPD e os seus ésteres devido a um requisito de um cliente Alemão. São vendidos, para este cliente, bolos, bolachas e um *mix* de tostas: uma receita clássica e duas receitas com sabores, uma de tomate e outra de orégãos. Desde sempre, este cliente solicitou à empresa análises aos produtos para ele vendidos de forma a avaliar se os valores do contaminante eram satisfatórios. Estas análises são feitas num laboratório acreditado para o tipo de análise, que no caso deste cliente exige que seja feito na *Eurofins Leipzig*, na Alemanha. Relativamente ao requisito estabelecido, é exigido que os produtos apresentem metade da dose diária recomendada pela EFSA. Devido ao novo parecer científico da EFSA, a DDA diminui de 2 µg/kg de peso corporal para 0,8 µg/kg de peso corporal. No início do ano de 2016, a empresa alterou a formulação das tostas e, entre outras matérias primas, mudou a referência do óleo de palma utilizado para uma referência com baixos teores de 3-MCPD. O fornecedor deste óleo garantiu que o teor de 3-MCPD (soma de 3-MCPD livre e ésteres de 3-MCPD) não excederia 1 mg/kg de gordura. Estes dois óleos, o novo e o antigo, são 100% palma, ou seja, apresentam a mesma composição diferindo apenas nas etapas da refinação de forma a garantir que teores mais baixos de 3-MCPD. Desta forma, era necessário perceber se a nova formulação das tostas estava de acordo com o requisito do cliente de acordo com o novo parecer científico da EFSA.

As tostas são um produto, que segundo a bibliografia e o contacto estabelecido com a *Tolboox for the Mitigation of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food*, podem apresentar um aumento do teor de 3-MCPD no decorrer do processo de fabrico. Segundo a *Tolboox for the Mitigation of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food*, o processo que, durante o fabrico, poderá levar a um aumento de 3-MCPD e dos seus ésteres no produto final é o processo de tostagem, processo pelo qual o pão passa para se obter o produto final ²⁸. Assim sendo, o estudo do processo de fabrico das tostas torna-se importante para avaliar as etapas que levam à possível formação do contaminante e, caso se verificasse, ações de melhoria do mesmo.

Observando os aspetos mencionados em cima, dos produtos vendidos para o cliente foram selecionadas as tostas para investigação. Para análise deste produto, é necessário ter dois aspetos em conta: o público alvo que são adultos (peso médio de um adulto é de 60 Kg) e o valor do *daily serving* que é de 50g (critério definido pelo cliente). Posto isto e aplicando o requisito do cliente sobre a DDA, os produtos não podem exceder 24 µg/*daily serving* de 3-MCPD. Na tabela em baixo, Tabela 3, encontram-se os valores máximos de 3-MCPD e para adultos segundo a DDA e segundo o requisito do cliente.

Tabela 3: Valores máximos de 3-MCPD e 3-MCPDE para adultos.

Parâmetro	Valor	Unidade
DDA	0,8	µg/ <i>daily serving</i>
Peso médio de um adulto	60	Kg
Limite de 3-MCPD e 3-MCPDE para adultos	48	µg/ <i>daily serving</i>
50% do limite de 3-MCPD e 3-MCPDE para adultos	24	µg/<i>daily serving</i>

Inicialmente foi tido em conta principalmente o processo de fabrico para ser feito o estudo e, para isso, foram retiradas amostras de massa, pão e tosta. O objetivo desta análise era avaliar o possível aumento do teor de 3-MCPD na passagem do produto pelas diferentes etapas do processo, como mostra a figura 9 em baixo, e perceber se ocorreria aumento do contaminante em alguma, no cozimento ou na tostagem.

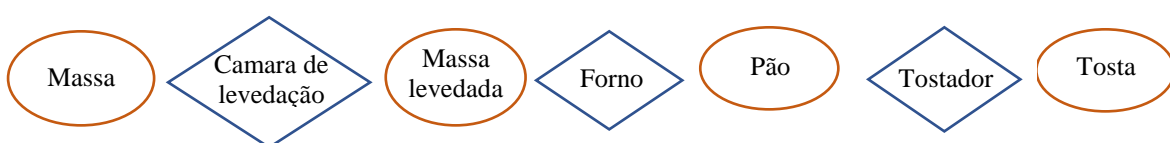


Figura 9: Etapas de formação das tostas estudadas.

As amostras foram retiradas em linha de produção de forma a ser o mais próximo do real possível para que se conseguisse também entender os pontos de risco/ controlo do processo de formação das tostas.

Através da análise dos diferentes ingredientes e das suas quantidades na receita, tentou-se perceber quais as matérias-primas de risco. Aquelas que conferem uma maior preocupação e que mais parecem ter influência para o teor do contaminante no produto final são o óleo

de palma e o desmoldante em pó (auxiliar tecnológico que permite retirar o pão das formas sem que este fique colado), por serem gorduras que derivam da palma. Desta forma, foram recolhidas amostras do óleo de palma das duas referências e desmoldante para análises e foi ainda feita uma extração da gordura das tostas para ser também analisada. Através de um estágio que abordou a mesma temática realizado na empresa, foi ainda possível obter o padrão de 3-MCPD na sua forma livre diluída em diclorometano com uma concentração de 100 ppm para ser também analisada na universidade. O 3-MCPD era da marca *Sigma* com a referência 32406.

As análises referidas em cima foram realizadas na Universidade de Aveiro com recurso à espectroscopia vibracional.

Após esta análise à receita, decidiu-se também não colocar desmoldante na amostra de pão e de tosta, continham apenas quantidades residuais que ficam nas formas ao longo da produção, com o objetivo de avaliar a interferência deste no teor de contaminante no produto final.

2.1.1 Materiais e Métodos

De forma a analisar o contaminante, das três receitas referidas das tostas, foi selecionada a receita de tomate pois é a aquela que durante o processo de formação necessita de quantidades superiores de desmoldante. Isto deve-se ao facto de a massa ter uma maior tendência de colar na lâmina de corte e nas formas. Para melhor compreensão do processo de produção das tostas e em que fases as amostras foram retiradas, encontra-se na figura 10 na página seguinte o fluxograma do processo de formação das tostas.

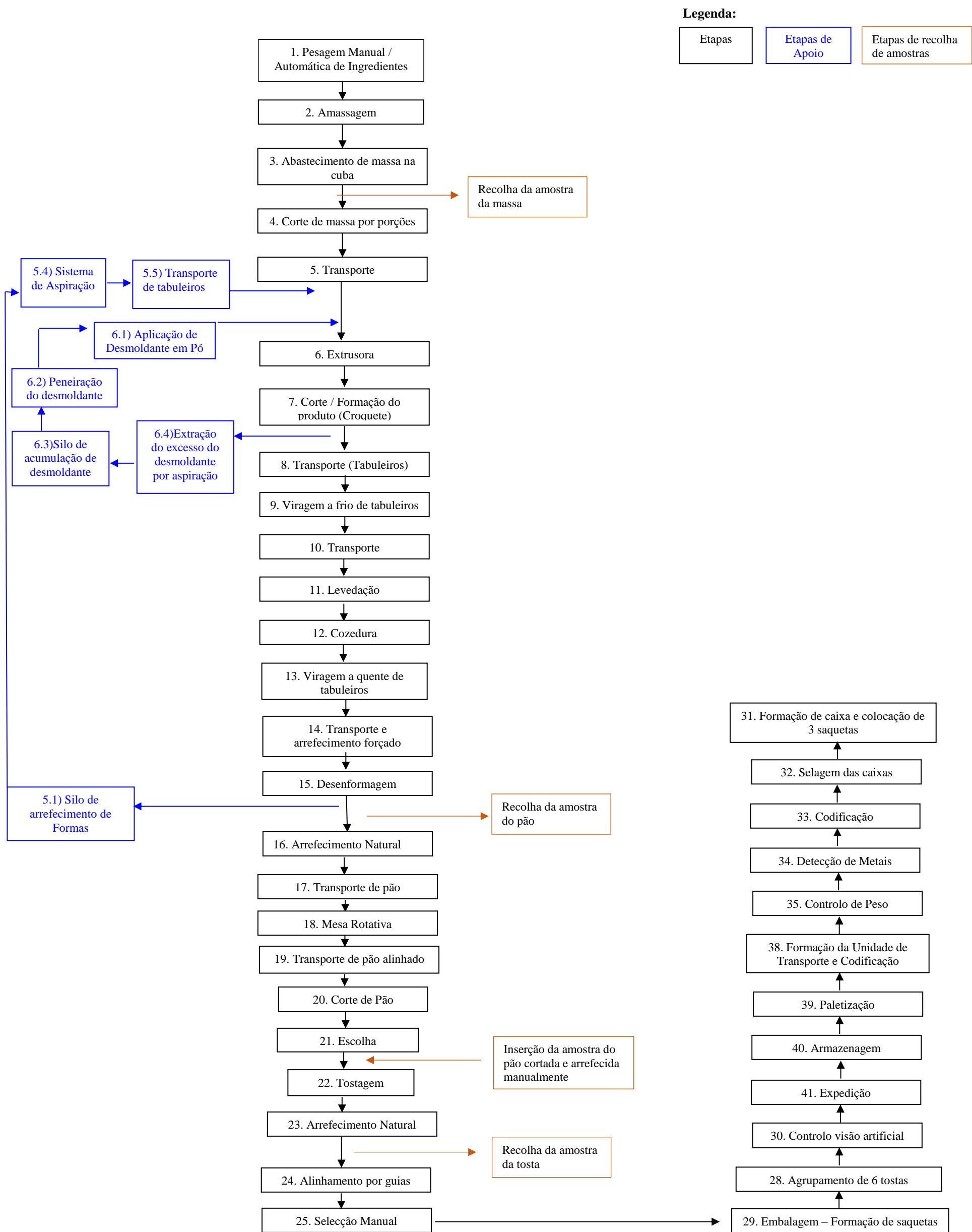


Figura 10: Fluxograma de processo de fabrico das tostas, adaptado.

A recolha das amostras das tostas foi feita de forma sequencial, ou seja, da mesma massa foi retirada a amostra de massa; do pão e da tosta sem desmoldante; e da tosta produzida da forma tradicional, com desmoldante.

A amostra de massa foi retirada, embalada, identificada e armazenada de imediato no frio para não deteriorar.

Na recolha das amostras de pão e tosta sem desmoldante foram necessárias algumas alterações ao fluxograma de processo. A primeira alteração foi a paragem, durante breves instantes, da máquina que fornece o desmoldante à linha. O arrefecimento, o corte e o embalamento foram feitos em fábrica piloto para não correr o risco de ocorrerem misturas das amostras com o produto final do cliente. Desta forma, podem existir pequenas variações que condicionam os resultados finais do estudo devido à impossibilidade de realizar todo o processo em linha de produção. Apenas as tostas sem alterações seguiram o fluxograma na íntegra.

A análise das amostras enviadas para o laboratório externo foi feita com recurso ao método *DGF C-IV 17 (10), mod., PV 2101, GC-MS*, com o código *LY03M*, os resultados são a soma do 3-MCPD livre com os 3-MCPDE e os compostos de 3-MCPD formados e vêm expressos em mg/kg de gordura.

A recolha de amostras das matérias primas foi feita nas entregas dos fornecedores, com lotes diferentes de forma a conseguir uma amostragem representativas. Das três matérias primas foram colhidos três lotes diferentes para cada uma. Para a extração da gordura das tostas a ser analisada, foi retirada uma tosta de cada uma das três embalagens do pacote e foram posteriormente trituradas/ homogeneizadas com recurso a um almofariz. Após isto, foi colocada uma parte num frasco e foram adicionados 20 mL de clorofórmio e outra parte num outro frasco em que foram adicionados 20mL de hexano. Ambos os frascos foram agitados vigorosamente durante 1 minuto e separou-se a fração orgânica.

Para análise das amostras referidas em cima, foi utilizada a técnica de espectroscopia vibracional. Os espectros de infravermelho médio foram adquiridos num espectrómetro *Bruker ALPHA (FT-IR)* com acessório de reflexão total atenuada (ATR). Foram acumulados 64 varrimentos com uma resolução de 4 entre 4000 a 600 cm^{-1} . Para a análise do 3-MCPD uma gota da amostra diluída em diclorometano foi colocada no cristal de ATR, e deixou-se evaporar até secar. As restantes amostras, como não necessitavam de

preparação prévia nem de nenhum cuidado em especial, foram apenas colocadas no cristal de ATR.

De uma forma geral, a espectroscopia vibracional é a designação coletiva usada para descrever duas técnicas analíticas - espectroscopia de infravermelho e *Raman*. A espectroscopia de infravermelho (IR) é uma ferramenta não-destrutiva, não-invasiva que fornece informações sobre a composição molecular, estrutura e interações dentro de uma amostra. Estas técnicas medem os níveis de energia vibratória que estão associados às ligações químicas na amostra. O espectro da amostra estudada é único, como uma impressão digital, e a espectroscopia vibracional é usada para identificação, caracterização, elucidação de estrutura, monitoramento de reação, controle de qualidade e garantia de qualidade.

Na espectroscopia de infravermelho, a amostra é irradiada com luz policromática e um fóton de luz é absorvido quando a frequência (energia) da luz absorvida corresponde à energia necessária para que uma ligação particular vibre dentro da amostra. Para que uma vibração seja infravermelha ativa, o momento dipolar molecular deve mudar durante a vibração ⁴².

As informações moleculares e estruturais são obtidas através de um exame cuidadoso dos espectros, tomando nota especial da posição da banda, da forma de linha e da intensidade.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Análises ao produto

Com o novo parecer da EFSA e, aplicando o requisito do cliente, a nova formulação encontrar-se-ia com teores de 3-MCPD no produto final acima do recomendado (24 µg/*daily serving*). Note-se que, o resultado analítico mais elevado para a receita antiga foi de 0,7 mg 3-MCPD/kg de produto. Para poder analisar o valor obtido das análises é necessário efetuar um cálculo para converter o valor para *daily serving*. Como referido anteriormente, a *daily serving* para as tostas é de 50g, assim obtém-se o seguinte resultado:

$$\begin{array}{lcl} 0,7 \text{ mg 3-MCPD} & \text{-----} & 1000\text{g de produto} \\ x & \text{-----} & 50\text{g de produto} \\ x = \frac{0,7 \times 50}{1000} = 0,035 \text{ mg/daily serving} = 35 \text{ µg/daily serving} \end{array}$$

Na tabela 4, estão descritos os resultados das amostras enviadas para o laboratório externo, pão sem desmoldante, tostas sem desmoldante e tostas com a nova formulação.

Tabela 4: Resultados analíticos referentes a análises de 3-MCPD nas amostras em estudo.

Produtos	3-MCPD (soma de 3-MCPD livre, 3-MCPDE e GE)
Pão sem desmoldante	0.86 mg/ Kg de gordura
Tosta sem desmoldante	1.05 mg/ Kg de gordura
Tosta sem alteração	0.70 mg/ Kg de gordura

Os resultados, nos boletins de análise, são expressos em Kg de gordura sendo, assim, necessário calcular o valor do contaminante no produto final e, posteriormente, para a *daily serving*. Para realizar os cálculos é ainda necessário o teor de gordura no produto final para cada uma das amostras. Para as tostas sem alteração foi utilizado o teor de gordura de 15,9, valor do boletim da análise físico-química realizado ao produto para cumprir com o plano de inspeção e ensaio da empresa. Já para o cálculo para o pão e para as tostas sem desmoldante foi utilizado o valor teórico de gordura do produto, cerca de 12,3g. Este valor é obtido do cálculo efetuado a partir dos valores médios conhecidos relativos aos

ingredientes utilizados, sem contabilizar o desmoldante. Em baixo são demonstrados os cálculos para a tosta sem alterações:

- 1) O valor do boletim é 0,70 mg/Kg de gordura sendo assim necessário o valor na gordura do produto, assim vem:

$$\begin{array}{rcl} 0,7 \text{ mg 3-MCPD} & \text{-----} & 1000\text{g de gordura} \\ x & \text{-----} & 15,9\text{g de gordura} \\ x = \frac{0,7 \times 15,9}{1000} & = & 0,0111 \text{ mg/15,9g gordura} = 0,011 \text{ mg/100g de produto final} \end{array}$$

- 2) Por *daily serving* vem:

$$\begin{array}{rcl} 0,011 \text{ mg 3-MCPD} & \text{-----} & 100\text{g de produto final} \\ x & \text{-----} & 50\text{g de produto} \\ x = \frac{0,011 \times 50}{100} & = & 0,0056 \text{ mg/daily serving} = 5,6 \mu\text{g/daily serving} \end{array}$$

Os cálculos relativos às restantes análises são semelhantes, variando apenas a quantidade de gordura no produto. A tabela seguinte, tabela 5, reflete os resultados para as três amostras analisadas.

Tabela 5: Resultados analíticos de 3-MCPD/kg gordura e de 3-MCPD/50g para cada amostra analisada.

Produtos	3-MCPD/ 100g de produto final	3-MCPD/ 50g
Pão sem desmoldante	0,0106 mg/ 100g de produto final	5,3 $\mu\text{g/daily serving}$
Tosta sem desmoldante	0,0129 mg/ 100g de produto final	6,5 $\mu\text{g/daily serving}$
Tosta com desmoldante	0,0111 mg/ 100g de produto final	5,6 $\mu\text{g/daily serving}$

Analisando os resultados é possível obter diferentes conclusões. Numa primeira instância e, talvez aquela que mais interesse tem para a empresa, será o facto do valor de 3-MCPD por *daily serving* apresentar valores inferiores aos que o cliente estabelece como requisito (< 24 $\mu\text{g/daily serving}$). Desta forma, a nova formulação das tostas dá resposta ao atual parecer científico da ESFA e ao requisito do cliente.

Para os resultados da análise feita às duas amostras de tostas, eram esperados valores mais baixos de 3-MCPD em tostas sem desmoldante por conterem quantidades menores de gordura com origem na palma. Contudo, os valores obtidos não são os inicialmente expectáveis pois, a tosta com desmoldante, apresenta valores de 0.70 mg/ Kg de gordura e a tosta sem desmoldante apresenta valores de 1.05 mg/ Kg de gordura. Estes resultados levam-nos a acreditar que o desmoldante apresenta teores de 3-MCPD inferiores ao óleo de palma. Isto porque, as tostas com desmoldante apresentam teores mais elevados de gordura, mas não de contaminante. Desta forma, podemos estar perante a ocorrência de uma diluição do contaminante no produto final.

Ao comparar os resultados obtidos no pão e na tosta, o valor de 3-MCPD na tosta é superior ao valor no pão. Estes resultados parecem indicar que o processo de tostagem origina um aumento do contaminante no produto final. Contudo foi feita apenas uma análise pelo que para conclusões claras são necessárias análises a mais amostras. O processo de tostagem, processo que leva ao endurecimento do pão provocado pelo calor e, conseqüente, perda de água, ocorre pela passagem do pão por um forno durante 17 a 18 minutos. O tostador apresenta um mínimo de temperatura de 150° C e um máximo de temperatura de 260° C. Como é possível verificar pelos dados, no processo de tostagem são atingidas temperaturas ótimas para a formação do contaminante, temperaturas acima dos 200°C. Ora, com estas temperaturas o contaminante tem o ambiente ótimo para se formar. Todavia, pode ainda ser colocada uma outra questão relativa ao processo de tostagem. Como referido anteriormente, durante o processo ocorre a perda de água facto que leva à concentração da gordura, ou seja, sem a presença de água em, por exemplo, 100g de produto a quantidade de gordura será maior. É necessário, com o recurso a mais análises, deslindar se o aumento do contaminante é devido só ao à secagem, ou se aconteceu formação de mais contaminante durante a tostagem.

2.2.2 Análises às matérias primas

Inicialmente, obteve-se o espectro do composto 3-MCPD a fim de se conseguir definir os picos que o caracterizam e poderiam eventualmente ser usados como marcador. Uma gota da amostra diluída em diclorometano foi colocada no cristal de ATR, e deixou-se evaporar até secar (figura 11).

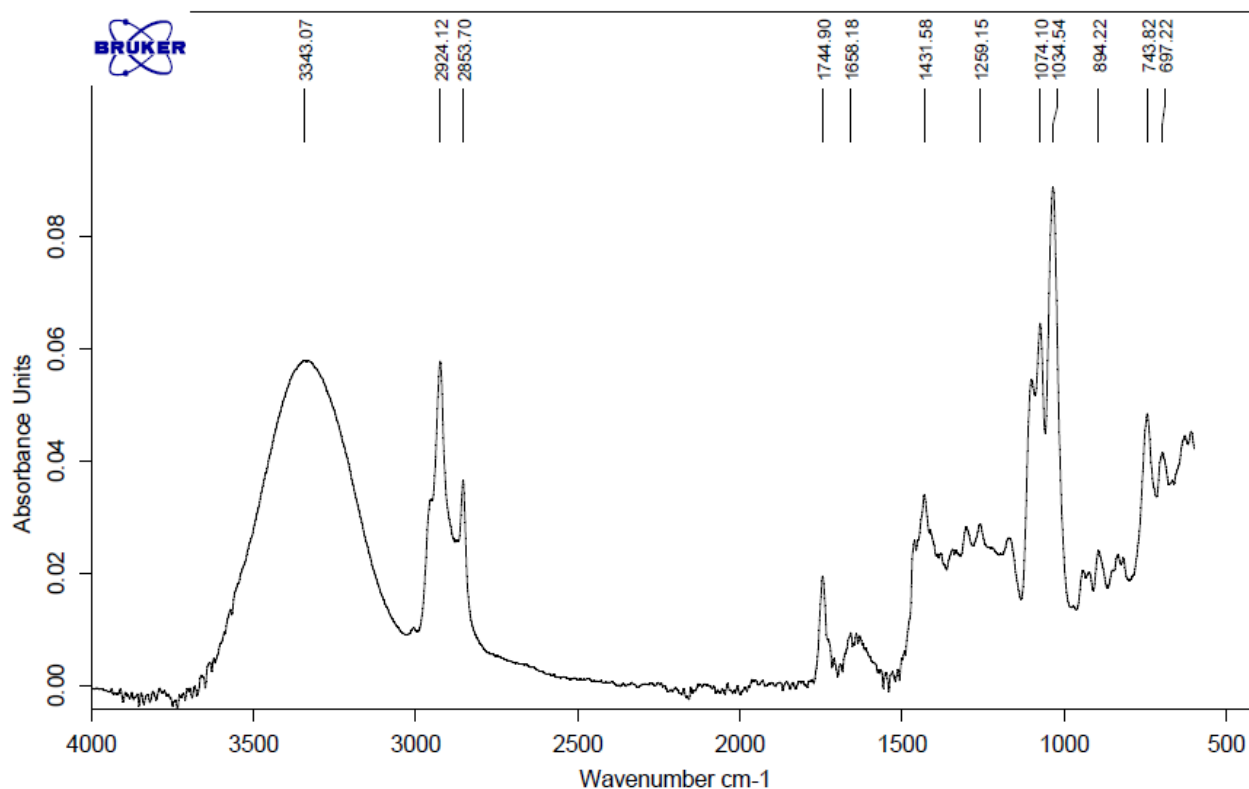


Figura 11: Espectro de FTIR do composto 3-MCPD.

Olhando para a estrutura química e para os picos obtidos no espectro, é possível identificar quatro zonas que caracterizam o 3-MCPD. O pico 3343 cm^{-1} corresponde a ligações O-H, este pico torna-se visível pois o contaminante encontra-se na sua forma livre, ou seja, não esterificado. Os picos a 2924 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} correspondem às ligações C-H dos grupos CH_2 . O ombro a 2959 cm^{-1} corresponde aos C-H dos grupos CH_3 . Os picos a 1074 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} correspondem à zona de ligações C-O. Na zona dos picos a 743 cm^{-1} e 697 cm^{-1} correspondem à ligação C-Cl. O espectro em cima deveria caracterizar, a estrutura de 3-MCPD na sua forma livre. Contudo, o pico a 1744 cm^{-1} correspondente à ligação éster indica que estamos perante uma molécula com alguma esterificação. Como já foi referido anteriormente, o contaminante aparece maioritariamente sob a forma esterificada nos óleos vegetais. Por este motivo, é necessário ter em conta que, quando o composto se encontra esterificado, o pico dos O-H na zona de 3343 cm^{-1} deve desaparecer e intensifica-se o pico da zona de 1744 cm^{-1} , assim como as bandas de 2924 e 2853 cm^{-1} que correspondem às ligações dos ésteres e dos C-H dos CH_2 dos ácidos gordos respetivamente. É também provável que possam existir ligeiros deslocamentos dos picos quando o contaminante está misturado com a gordura dos produtos, pois o composto adota diferentes interações

consoante o meio onde se encontra. Em conclusão, o espectro que se espera dos ésteres de 3-MCPD será praticamente idêntico aos espectros dos óleos. A única diferença expectável é a dos picos correspondentes à ligação C-Cl na zona dos 700 cm^{-1} .

Com o objetivo de comparar os dois tipos de óleos, o antigo e o novo (menos contaminado de acordo com o fornecedor), foram feitos os espectros dos mesmos (figura 12).

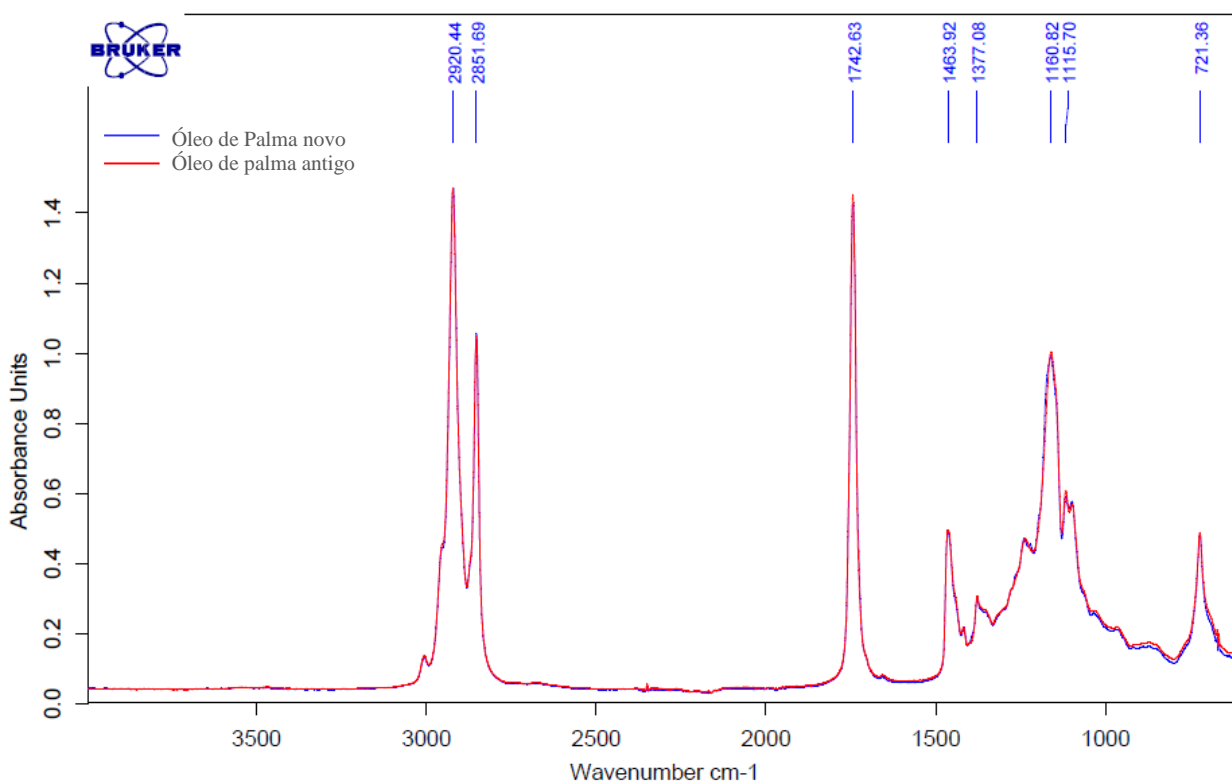


Figura 12: Espectro FT-IR do óleo de palma novo e antigo.

Como é possível verificar, os espectros das duas referências dos óleos de palma não apresentam diferenças, isto porque são ambos 100% palma e não permitem retirar conclusões que alertem sobre a presença do 3-MCPD, nem sequer na zona dos 700 cm^{-1} . Por este motivo, procedeu-se à contaminação intencional do óleo de palma antigo, que terá já um teor mais elevado de 3-MCPD que o óleo de palma novo, com o objetivo de aumentar a concentração tentando observar picos característicos de 3-MCPD. Desta forma, foram adicionadas ao óleo pequenas quantidades da amostra de 3-MCPD, garantindo sempre que o diclorometano tinha sido bem evaporado para não interferir com os espectros obtidos. O espectro em baixo, figura 13, mostra a alteração após contaminação do óleo de palma antigo e os dois óleos, o antigo e o novo.

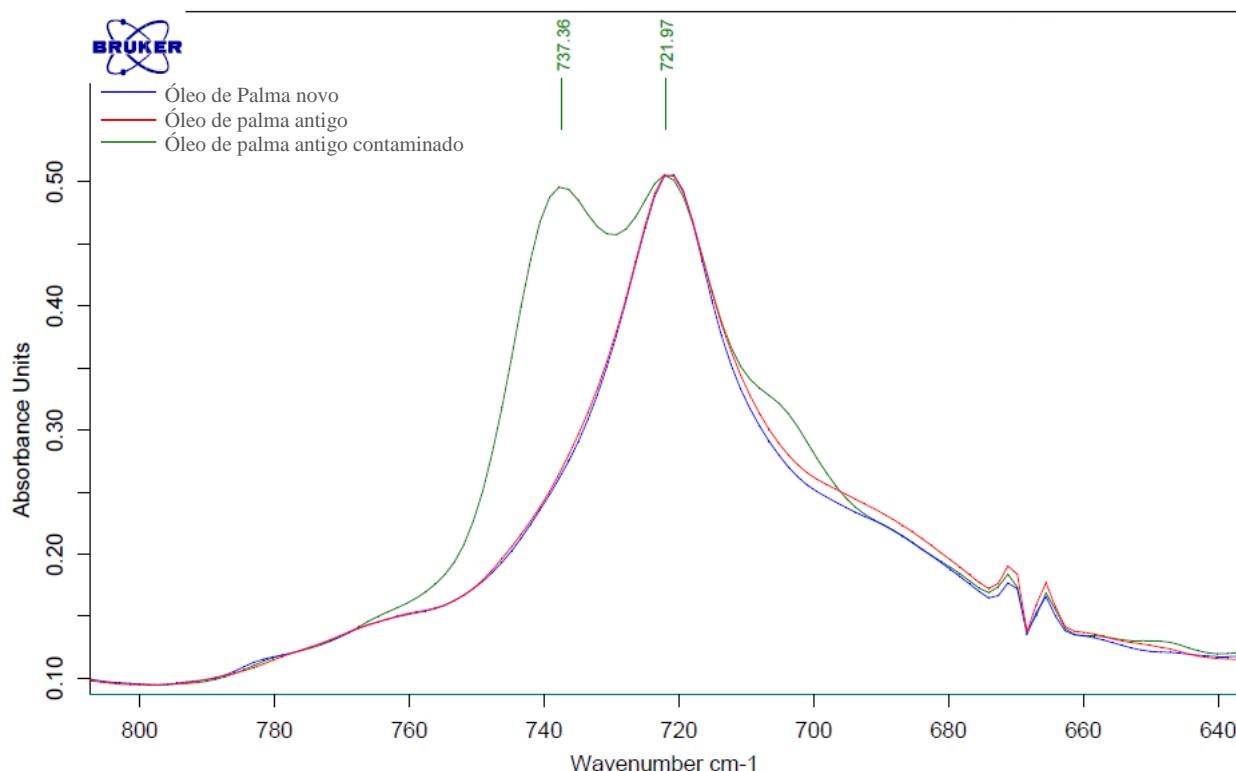


Figura 13: Espectro comparativo do óleo de palma novo, óleo de palma antigo e óleo de palma antigo contaminado com 3-MCPD.

A figura 13 apresenta uma aproximação à zona entre 640 a 800 cm^{-1} . Analisando os três espectros, é visível um pico a 722 cm^{-1} que corresponde ao *rocking* dos grupos CH_2 presentes nos triglicerídeos. É ainda possível verificar que o óleo de palma antigo intencionalmente contaminado apresenta um pico a 737 cm^{-1} e um ombro a 697 cm^{-1} originados pelo 3-MCPD, com uma pequena deslocação em comparação com o padrão puro, o que era previsível visto o contaminante se encontrar dissolvido no óleo. Estes picos correspondem a ligações de C-Cl que estão presentes na estrutura do 3-MCPD, mas não na estrutura dos óleos vegetais. Apesar de não ser um pico bem definido, é exequível usá-lo para a identificação da presença de 3-MCPD. Contudo, este pico só se começa a formar com concentrações elevadas de 3-MCPD visto que só é visível no óleo depois de ser feita a contaminação intencional. Este fato, leva a pensar que o 3-MCPD em baixas concentrações, nas matérias primas e possivelmente no produto acabado, não consegue ser detetado por esta técnica.

Para conseguir perceber se o óleo de palma e o desmoldante seriam gorduras idênticas, foi obtido o espectro de desmoldante e comparado com o óleo de palma (figura 14).

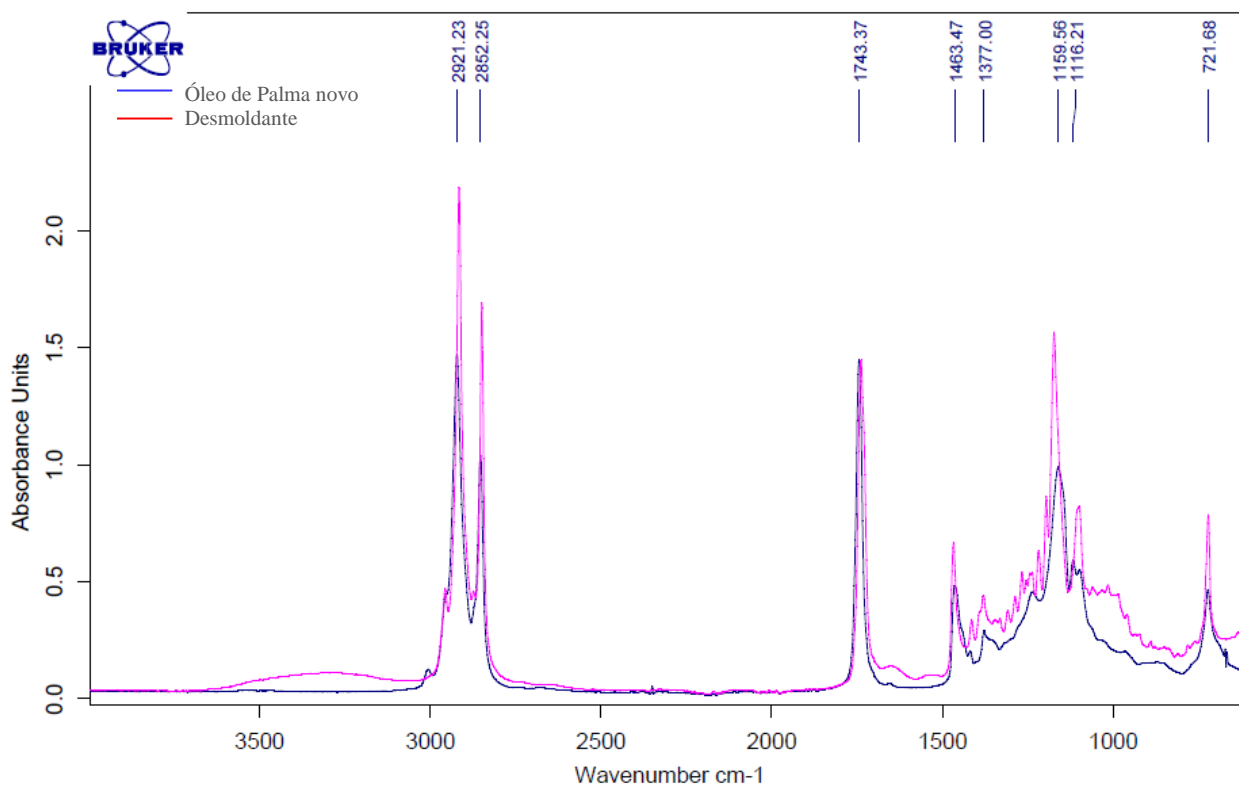


Figura 14: Espectros FT-IR do óleo de palma e do desmoldante.

Os dois espectros apresentam maioritariamente os mesmos picos, mas com intensidades diferentes. Os picos a 2921 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} correspondem às ligações C-H dos grupos CH_2 . O ombro a 2959 cm^{-1} corresponde aos C-H dos grupos CH_3 . O pico a 1743 cm^{-1} corresponde a ligações C=O dos ésteres e o pico 721 cm^{-1} aos grupos CH_2 . A região dos picos entre $1500\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ correspondem a ligações dos CH_2 , CH_3 e C-O. O óleo de palma apresenta ainda um ombro a 3003 cm^{-1} que corresponde às duplas ligações presentes, já o desmoldante não apresenta este pico mostrando que é uma gordura saturada de acordo com a informação da ficha técnica. O pico a 720 cm^{-1} está mais baixo no óleo de palma que no desmoldante pois o óleo apresenta maior número de duplas ligações o que diminui o número de grupos CH_2 . Os picos 2921 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} são maiores no desmoldante pois este apresenta maioritariamente ligações CH_2 .

Durante a análise dos espectros obtidos das amostras analisadas, surgiu a curiosidade de comparar o espectro da gordura extraída das tostas com o do óleo de palma e o do desmoldante. Os espectros destas comparações encontram-se nas figuras 15 e 16.

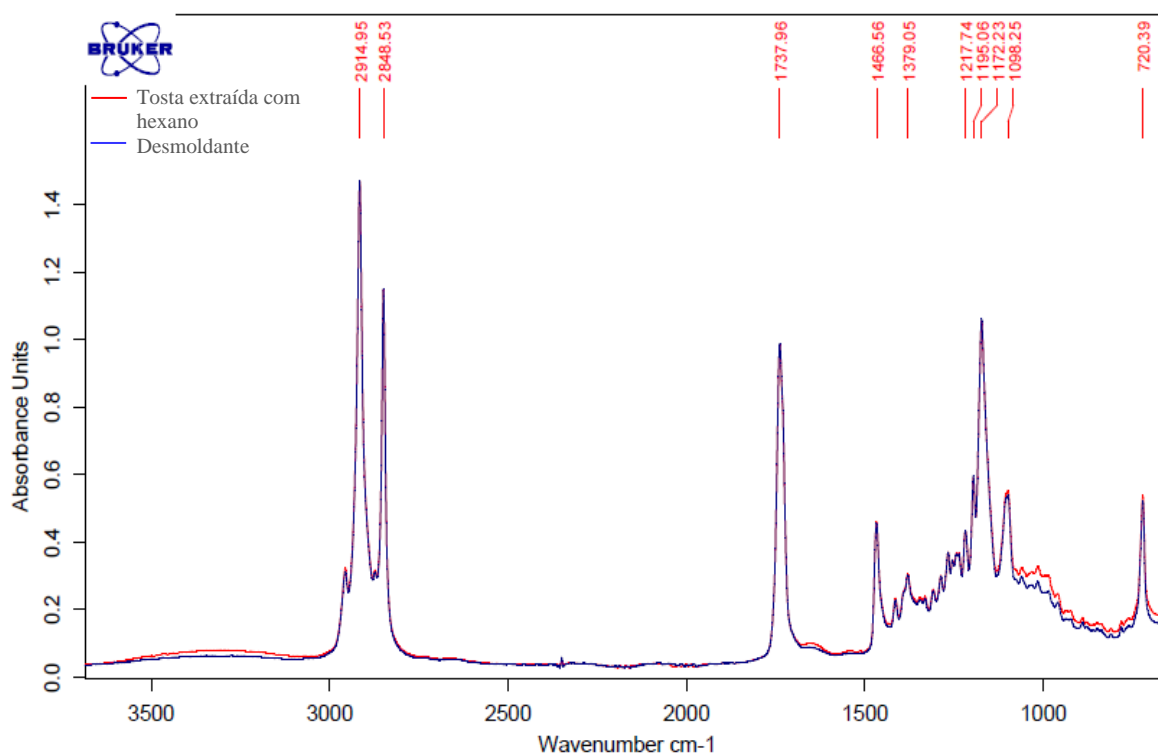


Figura 15: Espectros FT-IR da gordura extraída com hexano da tosta com o desmoldante.

Ao analisar os espectros da figura 15, são notórias as suas semelhanças sendo possível afirmar que a gordura das tostas extraída com hexano é, basicamente, desmoldante. Não há presença dos picos a 3003 cm^{-1} correspondentes a duplas ligações e há uma superposição praticamente total entre os dois espectros. Ao observar o percurso feito pelos tabuleiros para o seu arrefecimento (ver figura 9), é perceptível que estes não passam por um processo de lavagem rigorosa que retire o excesso de desmoldante. Isto é, a limpeza dos tabuleiros durante os turnos de produção é feita através de um sistema de aspiração para retirar qualquer desmoldante em pó (o desmoldante é um sólido granulado de cor branca). Este procedimento de limpeza pensar-se-ia ser adequado. Contudo, quando sujeito a altas temperaturas o desmoldante derrete, por ser uma gordura, ficando parte no tabuleiro que acaba por ser absorvida pelo pão. Após arrefecimento dos tabuleiros, a percentagem de desmoldante que fica no tabuleiro não volta à sua aparência inicial ficando, portanto, acumulando no tabuleiro. Desta forma, o método de limpeza aplicado não é considerado o mais correto, pois a aspiração não o consegue remover. A quantidade de desmoldante colocada é controlada ao longo do turno ficando registada no documento de Controlo na Fase de Formação. Quanto os colaboradores reparam que ocorre uma dificuldade na fase do corte/ formação do produto

aumentam a velocidade de queda do mesmo aumentando também a quantidade nos tabuleiros e, conseqüentemente, nas tostas. Atendendo a isto, recomenda-se uma análise ao processo de limpeza de forma a encontrar medidas alternativas para que seja feita uma limpeza mais eficaz dos tabuleiros bem como um controlo mais rigoroso da quantidade de desmoldante que é colocada.

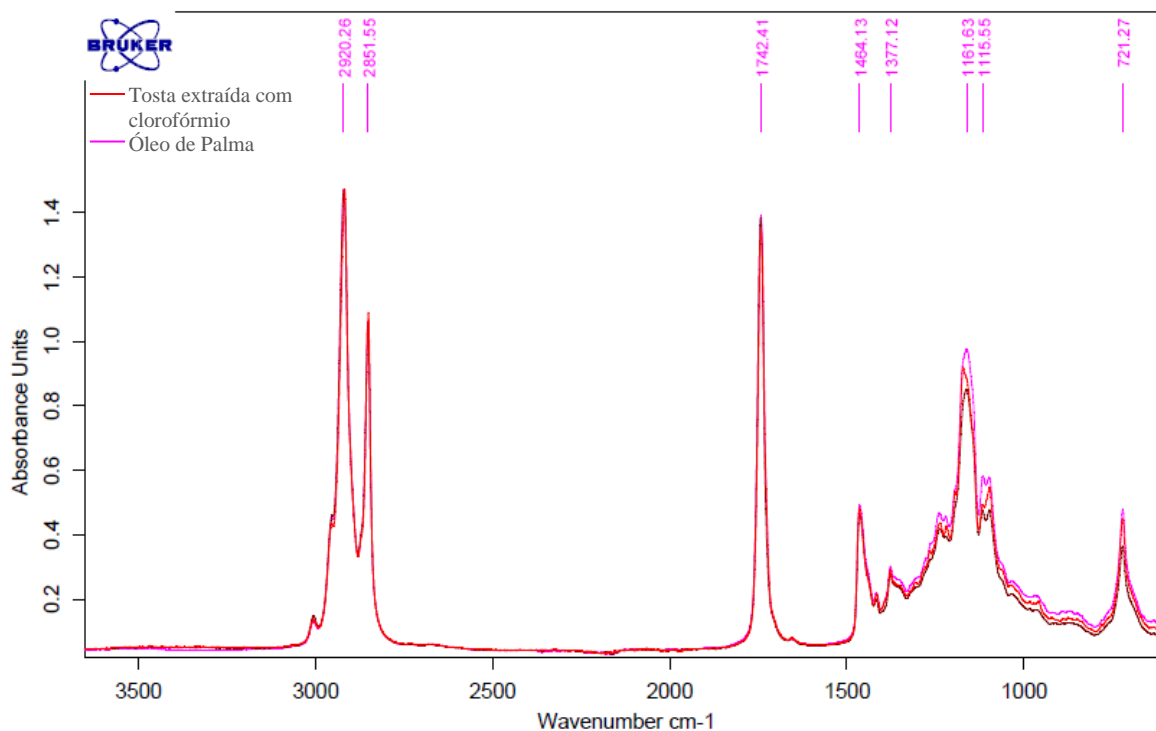


Figura 16: Espectro FT-IR comparativo da gordura extraída com clorofórmio da tosta com o óleo de palma.

Ao comparar o espectro da gordura da tosta extraída com clorofórmio com o espectro do óleo de palma, figura 2.16, foram também visíveis as semelhanças entre eles. Ambos os espectros apresentam o pico inconfundível das duplas ligações a 3003 cm^{-1} , assim como os de 2920 e 2851 cm^{-1} correspondentes a ligações C-H dos grupos CH_2 . O pico 1742 cm^{-1} corresponde a ligações C=O dos ésteres e o pico 721 cm^{-1} aos grupos CH_2 . A região dos picos entre $1500\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ corresponde à “impressão digital” do óleo que neste caso são ligações de CH_2 , CH_3 e C-O.

Olhando para a zona dos 700 cm^{-1} (comparar com o espectro do 3-MCPD na figura 2.10), não é possível determinar a presença do contaminante pois este apresenta uma estrutura química bastante semelhante à das gorduras e as quantidades de 3-MCPDE são pequenas, na casa dos ppm (partes por milhão), pelo que pode também não ser visível na análise por FT-IR.

2.2.3 Alternativas ao óleo de palma

A diminuição de 3-MCPD e 3-MCPDE no produto final passa em grande parte pela sua diminuição nas matérias-primas e, por isso, por um trabalho conjunto com os fornecedores das mesmas.

Relativamente ao óleo de palma foi conseguido em conjunto com um fornecedor do mesmo duas alternativas: um óleo de palma com baixos níveis de 3-MCPDE e GE e o uso de outros óleos/ misturas de óleos vegetais. Numa primeira instância, o fornecedor garante que faz uma escolha seletiva dos seus fornecedores, a fim de obter uma matéria prima de excelência em relação à quantidade de ácidos gordos livres, mono- e diglicerídeos, precursores de 3-MCPDE e GE. A primeira alternativa é conseguida através de alterações ao processo de refinação do óleo de palma. No processo em geral, conseguiu reduzir a presença dos precursores do contaminante, cloretos e mono- e diglicerídeos. Já na etapa de desodorização, etapa mais problemática do processo por atingir temperaturas ótimas para a formação do contaminante, conseguiu a diminuir para temperaturas nas quais a formação não é tão elevada. É garantida a eficácia do processo, contudo, e como era expectável leva a que haja uma menor produção e um aumento do custo da matéria prima. Nas tabelas em baixo, Tabela 6 e Tabela 7, é possível comparar os valores dos níveis médios do contaminante com recurso ao método convencional de refinação e após alterações feitas pelo fornecedor.

Tabela 6: Níveis médios de 3-MCPDE e GE com recurso ao processo de refinação convencional.

Óleos Refinados	Nível médio de 3-MCPDE (µg/kg)	Nível médio de GE (µg/kg)
Girassol	521	269
Milho	503	658
Palma	2912	3955
Coco	608	476
Óleo de Palmiste	624	421

Tabela 7: Níveis médios de 3-MCPDE e GE após alterações ao processo de refinação.

Óleos Refinados	Conteúdo médio de 3-MCPDE (µg/kg)	Conteúdo médio de GE (µg/kg)
Girassol	521	269
Milho	503	658
Palma	600	600
Coco	608	476
Óleo de Palmiste	624	421

Após análise das duas tabelas, é possível verificar que com a refinação proposta pelo fornecedor os níveis médios do contaminante atingem valores semelhantes a outros óleos vegetais refinados, cerca de 600 µg/kg. Este decréscimo é bastante vantajoso para a empresa por três motivos: primeiro, são conseguidos valores em todos os tipos de óleos vegetais abaixo dos teores máximos previstos na legislação a entrar em vigor em 2019, relativamente a GE. Note-se que para 3-MCPD não estão estabelecidos teores máximos, contudo os valores conseguidos pelo fornecedor, comparando ao inicialmente proposto pela EFSA, encontram-se a baixo; segundo, não seria necessário alterar o tipo de óleo vegetal não existindo também necessidade de estudar o comportamento da matéria prima em linha pois já é conhecido, podendo ser apenas necessários alguns ajustes; terceiro, seriam atingidos, dependendo da quantidade de óleo no produto, níveis do contaminante no produto final de acordo com o requisito do cliente.

No entanto, pode haver clientes que queiram retirar da formulação dos seus produtos a palma e tudo o que possa derivar da mesma por segurança. Nestes casos mais drásticos, é mesmo necessário a alteração do óleo de palma por outros óleos vegetais. Para estes casos, o fornecedor propõe o uso de outros óleos vegetais ou até mesmo misturas de óleos vegetais. Como alternativas, existem os óleos de sementes e os óleos de tropicais. Exemplos de óleos de sementes são o óleo de colza, o óleo de milho, o óleo de soja, o óleo de girassol e o óleo de girassol alto oleico. A diferença entre os dois últimos óleos está relacionada com a resistência à oxidação: o óleo de girassol alto oleico é mais resistente, sendo por isso vantajoso em relação ao primeiro. O óleo de coco é um exemplo de óleos tropicais.

Relativamente à legislação que irá entrar em vigor muito em breve, o fornecedor dá ainda a segurança que os óleos por ele produzidos estarão de acordo com os valores máximos que serão exigidos a esta indústria. Observando os valores descritos na tabela em cima, estes parecem dar resposta à legislação relativa aos óleos vegetais, tanto à inicialmente publicada como a que entrará em vigor. Contudo, para os 3-MCPD e 3-MCPDE teremos de aguardar o novo parecer científico da EFSA.

2.3 Conclusões e Perspetivas Futuras

Como referido anteriormente, o presente relatório de estágio propunha-se a auxiliar a empresa num estudo inicial acerca deste contaminante.

Relativamente às análises realizadas ao produto, estas foram bastante preliminares pois foi realizada apenas uma amostragem e foram tidos em conta aspetos gerais do processo, o que não torna os resultados conclusivos, mas uma base para a investigação futura. Nota-se que a produção das tostas é sazonal, este ano realizada em Janeiro. Por motivos de extravio da amostra de massa das tostas não foi depois possível realizar a análise à mesma, não sendo também possível obter uma nova amostra devido à sazonalidade da produção. Em primeiro lugar, a avaliação da interferência do processo nos teores de contaminante no produto final supõe que há um aumento no processo de tostagem. A dúvida é se este aumento se deve a uma formação de 3-MCPD ou se pode estar relacionado só com a perda de água do produto durante o processo levando a uma concentração de gordura e, consequentemente, aumento de 3-MCPD. Note-se que o aumento verificado através das análises não é um aumento significativo, ou seja, não coloca em causa o cumprimento do requisito do cliente. Contudo, é interessante a análise do processo para perceber qual a verdadeira origem do aumento do contaminante. Para isto, seria feita uma análise à massa, como inicialmente pensado, ao pão e às tostas de pelo menos 3 amostras de diferentes turnos de produção de forma a representar toda a produção. Para se ser mais preciso, pode ser considerada também uma análise da massa antes e depois da levedação, garantindo assim que o processo seria todo analisado.

Aparentemente, o desmoldante não tem influência na quantidade de 3-MCPD, contudo deve-se ter cuidado para minimizar a sua transferência para o produto final de forma a evitar a introdução de gordura no produto. Como foi analisado, as amostras de tostas sem desmoldante apresentam teores mais elevados do contaminante o que não era esperado. No entanto, esta é uma matéria prima que tem, na sua origem, a palma pelo que deve ser analisada em conjunto com o fornecedor de forma a perceber os reais valores de 3-MCPD.

Relativamente às matérias primas, verificou-se que a espectroscopia vibracional é um bom método para analisar a composição da gordura das tostas, mas não é adequado para a determinação de 3-MCPD e dos seus ésteres, devido à forte semelhança química nas estruturas químicas entre o contaminante e as gorduras vegetais e às baixas concentrações

do contaminante. Desta forma, o controlo deste tipo de contaminantes passará sempre por estabelecer contacto com os fornecedores. Como, muito em breve, entrará em vigor a legislação para este contaminante cabe aos fornecedores dos óleos vegetais e do desmoldante facultar evidências sobre os controlos efetuados bem como resultados analíticos feitos para o 3-MCPD, os seus ésteres e GE.

Foi ainda possível avaliar aspetos nutricionais relacionados com as quantidades de gordura do produto estudado. Relativamente a este tema, é realmente importante um estudo/ análise por parte da empresa para avaliar alternativas de forma a melhorar o teor de gordura no produto final. Neste momento, o desmoldante está a ter mais contributo do que seria realmente desejado. Como auxiliar tecnológico não se torna obrigatória a sua rotulagem, contudo este está a influenciar os valores nutricionais, conferindo ao produto valores bastantes mais elevados de gordura, cerca de 4g a mais. Numa primeira instância, será necessário avaliar a existência de produtos de limpeza que retirem a gordura sem que danificar o material das formas dos tabuleiros nem comprometer a qualidade e segurança do produto final. Isto porque, a limpeza das formas tem um custo elevado e não podem ser limpas com qualquer produto para não danificar. A possibilidade de introduzir etapas de limpeza durante um turno de produção para que não se acumulem quantidades excessivas de desmoldante nas formas é também uma alternativa. O facto de acrescentar uma etapa de lavagem mais eficaz, após a desenformagem das formas, torna-se bastante vantajoso pois a quantidade de gordura nas tostas diminuiria. É que na fase de formação da massa das tostas, para 100g de produto são colocadas cerca de 12g de óleo de palma e nas análises físico-químicas ao produto são obtidos resultados de 16g de gordura. Como alternativa final e, talvez, a mais drástica seria a troca do desmoldante por uma matéria prima em que o principal ingrediente não fosse uma gordura vegetal de modo que não incrementasse os níveis de gordura no produto final.

Finalmente, foi ainda possível averiguar que, num trabalho conjunto com os fornecedores, são conseguidos teores mais baixos do contaminante nos óleos vegetais de forma a garantir valores aceitáveis do contaminante nos produtos finais. Contudo, existem também alternativas ao óleo de palma para casos de clientes que prefiram retirar esta matéria prima dos seus produtos. Para aplicar as alternativas, serão sempre necessários estudos por parte no departamento de I&D para analisar o seu comportamento durante a produção; se mantêm,

do produto final, as características organoléticas desejadas e avaliar as alterações na longevidade do produto, pois as alternativas têm tendência para oxidar mais rapidamente que o óleo de palma.

As análises para o 3-MCPD e os seus ésteres, envolvem custos bastante elevados. Por exemplo, uma análise ao 3-MCPD em laboratório externo custa 155€ e um padrão de 100mg de 3-MCPD custa 71,85€. Pelo que, associá-lo a um projeto de investigação pelo seu elevado interesse e por ser um tema bastante atual, seria uma mais valia de forma a ter as condições necessárias para uma investigação de sucesso. Como trabalho futuro seria interessante e importante desenvolver um método de análise económico e eficaz pois, em Portugal, não existe nenhum laboratório que faça este tipo de análises e que seja acreditado para tal. O desenvolvimento do método seria talvez o primeiro passo a dar para facilitar a investigação futura de forma a não ser necessário recorrer a laboratórios externos para continuar a investigação neste tema.

Capítulo III - Atividades desenvolvidas na empresa

Na empresa, o estágio curricular foi realizado no departamento de Rotulagem e Embalagem integrado no departamento de Desenvolvimento de Novos Negócios. O plano de estágio teve como base a Legislação Europeia e Internacional relativa à prestação de informação aos consumidores sobre géneros alimentícios (rotulagem) através do conhecimento e aplicação de requisitos legais de rotulagem na avaliação de rótulos e preenchimento de documentação técnica a partilhar com os clientes.

Foi ainda possível a participação nas inspeções mensais nas linhas de produção, requisito dos Referenciais BRC – Global Standard Food Safety (Capítulo 3, tópico 3.4.4) ⁴³ e IFS – International Feature Standards (Capítulo 5, tópico 5.2) ⁴⁴, que são coordenadas pelo departamento da Qualidade.

3.1 Departamento de Rotulagem e Embalagem

A rotulagem alimentar e nutricional de um alimento é essencial para garantir a confiança e informar o consumidor e, por isso, qualquer alimento embalado tendo valor predeterminado (peso/conteúdo ou preço), necessita de um rótulo. A indústria alimentar comunica com os consumidores através dos rótulos permitindo-lhes assim fazer escolhas alimentares adequadas a cada situação. As informações que constam no rótulo devem ser cientificamente corretas e não induzir em erro, por isso, as normas de rotulagem são essenciais para certificar a segurança e qualidade dos alimentos. Os requisitos regulamentares para a rotulagem de produtos alimentares, alegando benefícios nutricionais devem ser entendidos tanto pela indústria como pelos cientistas para que seja possível o desenvolvimento de novos produtos alimentares ⁴⁵.

A União Europeia tem legislado em função da garantia de segurança alimentar e da melhoria da comunicação entre o produtor e o consumidor, e assim foi publicado o Regulamento (EU) nº1169/2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, entrando em vigor a 13 de dezembro de 2016 a obrigatoriedade da declaração nutricional. O presente regulamento estabelece a base para garantir um elevado nível de defesa do consumidor no que se refere à informação sobre os géneros alimentícios, tendo em

conta as diferenças de percepção e as necessidades de informação dos consumidores, e assegurando simultaneamente o bom funcionamento do mercado interno. Este consolida e atualiza dois campos da legislação no que diz respeito à rotulagem: os rótulos gerais dos produtos alimentares, regulamentado pela diretiva 2000/13/CEE, e da rotulagem nutricional, objetivo da diretiva 90/496/CEE. Segundo este mesmo regulamento, no rótulo de um produto alimentar é obrigatório ^{46,47}:

- A denominação do género alimentício;
- A lista de ingredientes;
- A indicação de todos os ingredientes ou auxiliares tecnológicos enumerados no anexo II ou derivados de uma substância ou produto enumerados no anexo II que provoquem alergias ou intolerâncias, utilizados no fabrico ou na preparação de um género alimentício e que continuem presentes no produto acabado, mesmo sob uma forma alterada;
- A quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes; e) A quantidade líquida do género alimentício;
- A data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo;
- As condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização;
- O nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do setor alimentar referido no artigo 8º, n.º 1;
- O país de origem ou o local de proveniência quando previsto no artigo 26º;
- O modo de emprego, quando a sua omissão dificultar uma utilização adequada do género alimentício;
- Relativamente às bebidas com um título alcoométrico volumétrico superior a 1,2 %, o título alcoométrico volúmico adquirido;
- Uma declaração nutricional.

Antes de ser elaborado o rótulo de um produto e, quando se trata de produtos de marca própria, o cliente tem de prová-lo e aprová-lo. Para isso, são enviadas amostras do produto em conjunto com uma proposta de ficha técnica desse mesmo produto. Nesta vão descritas todas as informações acerca do produto: designação e descrição do produto; a listagem de ingredientes; os valores nutricionais; os alergénios; a validade; o público alvo; as alegações nutricionais ou de saúde; entre outros.

Foi nesta área que iniciei o meu estágio e que fui evoluindo de forma gradual. Inicialmente, e para melhor compreensão e conhecimento dos produtos da Dan Cake, fiquei responsável por fazer a revisão das fichas técnicas dos produtos e emitir as que ainda se encontravam como propostas e que já tinham sido aprovadas e, por fim, por preencher documentação de clientes nomeadamente especificações de produto acabado marca própria e a contactar com os mesmos. As fichas técnicas de produto são elaboradas com base no o Regulamento (EU) nº1169/2011, em documento *word* e contém 18 tópicos:

- Descrição do produto;
- Os ingredientes, onde é colocada a listagem de ingredientes, ordenada de forma decrescente da quantidade de cada um, baseada na formulação do produto;
- Características organoléticas, como a cor, o sabor, a textura, o cheiro e o aspeto;
- Características físico-químicas, como a humidade, cinzas, atividade da água (aW);
- Informação nutricional, onde são colocados os valores nutricionais, com as tolerâncias e os arredondamentos baseados no *Guidance Document For Competent Authorities For The Control Of Compliance With EU Legislation On: Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers* ⁴⁸;
- Características microbiológicas;
- Limites máximos dos contaminantes obrigatórios na legislação;
- Os alérgenos presentes no produto e as possíveis contaminações cruzadas dos processos de fabrico ou provenientes do fornecedor;
- Declarações de como não são usados organismos geneticamente modificados (OGM), as matérias primas e produtos não são sujeitos a ionização e de como o uso de aditivos ou os resíduos de pesticidas estão conforme a lei;
- Validade do produto e a explicação da codificação da mesma: x meses desde o fabrico, marcada com dia, mês e ano (dd/mm/yyyy);
- Condições de armazenamento e transporte: se necessária a conservação/ transporte em local fresco ou refrigerado;

- Descrição e explicação da codificação do lote: o lote é definido por Lxxxxyz, em que xxx representa a data do calendário juliano referente à data de produção, y a linha de fabrico e z o turno de fabrico para Coimbra e definido por Lxxyyyzzv, em que xx representa o ano, yyy representa o dia do calendário Juliano, zz representa a linha de produção e v o turno de produção, para a fábrica da Póvoa de Santa Iria.
- Público alvo, por exemplo crianças, jovens, adultos, grávidas, e utilização prevista do produto, que no caso da empresa são de consumo imediato, sem transformação prévia
- Outras informações que sejam relevantes ao consumidor.

As especificações de produto acabado marca própria acabam por ser transposições das fichas técnicas dos produtos. Contudo, é sempre necessária uma avaliação da informação de acordo com a legislação do país de destino do produto final. Por exemplo, para os Estados Unidos da América e para o Canadá é necessário ter em conta o *Code of Federal Regulations, Title 21: Food and Drugs, Part 101: Food Labeling* da *Food and Drug Administration* (FDA). Desta forma, o preenchimento dos mesmos tem início por parte da empresa e é depois partilhado com o cliente para ser analisado. Após aprovação da especificação de produto acabado por ambas as partes, as informações obrigatórias a constar no rótulo são passadas para um ficheiro que será a arte final do material de embalagem. Nesta fase, há um contacto permanente com o cliente para que haja aprovação a nível da informação nutricional bem como das dimensões do material e da localização das zonas em que será colocada a data de validade e lote. Esta aprovação tem de ser feita tanto da parte da empresa como do cliente, de modo a que o rótulo final não apresente erros ou falhas nem induza o consumidor em erro.

De todos os trabalhos em que estive envolvida durante o tempo de estágio, existiram dois clientes pelos quais fiquei responsável após a aprovação de amostras do produto final por parte do cliente até à aprovação da arte final da embalagem do produto. Um destes trabalhos envolvia dois tipos de produtos, Bolachas Extraordinária de Chocolate e Avelã e Bolachas Extraordinárias Chocolate Branco e *Cranberries*, para um retalhista de mercado nacional, por isso, baseado na legislação Europeia. O outro trabalho já envolvia uma gama mais

alargada de produtos, *Apple Strudel Cookies*, *Brownies Cookies*, *Chocolate Hazelnut Cookies*, *Chunky Chocolate Cookies* e *White Chocolate & Craberry Cookies*, para o cliente de marca própria da África do Sul, e, por isso, baseado na legislação desse país.

3.2 Departamento da Qualidade

Segundo o BRC e o IFS, referenciais pelos quais a empresa é certificada, deve haver um programa de inspeções documentadas para garantir que o ambiente da fábrica e o equipamento de processamento sejam mantidos em condições adequadas para a produção de alimentos. Essas inspeções devem incluir verificações do estado de higiene para avaliar o desempenho de limpeza e verificações às instalações fabris para identificar riscos para o produto quer do edifício quer do equipamento. A frequência destas inspeções deve basear-se numa análise de risco, mas não deve ser inferior a uma vez por mês nas áreas de produtos aberto.

No caso da Dan Cake, são distribuídas mensalmente as Inspeções pelos responsáveis. Estes inspetores internos pertencem a uma equipa multidisciplinar, cabe ao coordenador distribuir as linhas/ áreas a inspecionar pela equipa, assegurando que os inspetores não auditam a sua área de trabalho e que são realizadas inspeções nos diferentes turnos de trabalho. A qualificação da equipa de inspetores é feita através de uma formação interna sobre o procedimento de auditorias e inspeções englobando a metodologia e documentação associada bem como a aplicação prática da *check-list* utilizada na realização das inspeções.

Nesta *check-list*, estão contemplados os requisitos dos Referenciais IFS e BRC relacionados com alguns pré-requisitos do sistema HACCP destinados a questões práticas do dia-a-dia em que são controlados os riscos relacionados com o ambiente fabril (instalações e estruturas, serviços, pessoal, instalações e equipamentos). Assim, os pré-requisitos contemplados na *check-list* são: Instalações; Higiene de Instalações e Equipamentos; Controlo de Pragas; Higiene Pessoal; Gestão de Vidros, Plásticos e Acrílicos.

O pré-requisito Instalações estabelece regras e medidas em relação ao estado de conservação das instalações fabris, verificando nas inspeções a conservação de paredes, tetos, equipamentos, tendo como base os referenciais BRC e IFS e também o *Codex Alimentarius*.

O pré-requisito Higiene de Instalações e Equipamentos estabelece regras relativamente à limpeza das instalações e higienização dos equipamentos tendo por base o *Codex Alimentarius* bem como os requisitos dos referenciais BRC e IFS. As inspeções servem para

validar a limpeza das instalações verificando o estado de higiene de equipamentos, paredes, tetos, pavimento, e os ralos de esgoto e outros requisitos relacionados com o pré-requisito.

Relativamente ao pré-requisito Controlo de Pragas, as regras devem certificar a prevenção, deteção e controlo de pragas, tendo também em conta as boas práticas do *Codex Alimentarius* e os requisitos dos referencias BRC e IFS. Assim, nas inspeções é necessária a verificação do cumprimento das regras estabelecidas de forma a minimizar a probabilidade de infestação avaliando se os postos de engodo e detetores estão identificados, no local correto e em bom estado de conservação, se os inseto-caçadores estão em funcionamento, se existem vestígios de pragas, se as portas de acesso ao exterior bem como as que dão para outros locais de trabalho se encontram fechadas, etc.

O pré-requisito da Higiene Pessoal define regras respeitantes aos colaboradores, de forma a certificar que os operadores que, direta ou indiretamente, contactam com os alimentos não os contaminam e que seguem as regras de higiene pessoal estabelecidas. Durante as inspeções mensais é feita a avaliação dos requisitos aplicáveis à higiene pessoal, nomeadamente se os locais de lavagem e desinfeção das mãos estão a funcionar corretamente, se as fardas são adequadas ao setor e se foi feita uma verificação às mesmas no início de turno, se os colaboradores apresentam sinais de doenças e se os cortes que possam apresentar estão corretamente protegidos, etc.

Em relação ao pré-requisito da Gestão de Vidros, Plásticos e Acrílicos os objetivos do mesmo passam por definir critérios para a correta utilização, identificação, verificação e manutenção dos vidros, plásticos e acrílicos. Segundo os referenciais IFS e BRC, todos os objetos que contemplem este tipo de materiais (utensílios, equipamentos ou componentes de equipamentos, lâmpadas, janelas, divisória de vidro ou de plástico rígido), e que estejam presentes nas áreas de manipulação de matérias-primas, processamento, embalagem e armazenagem, deve ser assegurada a existência do cadastro com a identificação dos mesmos. Neste deve estar especificada a localização, quantidade e avaliado o nível de risco desses componentes ou utensílios. Durante as inspeções é, então, necessário assegurar que o cadastro está atualizado e que todos os materiais que este contém estão corretamente identificados, em bom estado de utilização e estão a ser utilizados nos locais corretos.

Após a inspeção às linhas de produção, é necessário elaborar um Plano de Ações Corretivas com todas as não conformidades (incumprimento de um requisito especificado) observadas no terreno. São também elaboradas e descritas as ações corretivas (ação desencadeada com o objetivo de eliminar as causas que originam determinada não conformidade), de modo a reduzir ou eliminar a possibilidade da sua recorrência. Esta não é apenas uma correção imediata para resolver qualquer falha ou problema e pode envolver alterações em documentos, equipamentos e/ou processos, funcionando como uma ferramenta de melhoria do Sistema da Qualidade. Este plano é dado a conhecer aos responsáveis pela implementação das ações, contendo as causas das não conformidades e o prazo para concluir a ação. Durante a inspeção, são também observadas as não conformidades das inspeções mensais anteriores e, caso já se encontrem resolvidas, consta também no relatório essa informação.

Em suma, as inspeções mensais tornam-se num instrumento eficaz na verificação do sistema de segurança alimentar implementado, pois permite apresentar evidências de que o sistema de segurança alimentar da empresa garante a inocuidade dos alimentos bem como assegurar a conformidade dos seus produtos e a melhoria contínua.

3.3 Conclusão

O estágio na empresa Dan Cake (Portugal), S.A. cumpriu com os objetivos iniciais propostos. Ao longo dos nove meses foi-me dada a liberdade e confiança para realizar o trabalho de forma autónoma, colocando em mim responsabilidade e liberdade para aprender fazendo. Obtive conhecimentos acerca da Legislação Europeia e Mundial relativamente à rotulagem de produtos, uma área que me era completamente desconhecida, e de todo o processo inerente à colocação de um produto novo no mercado. Permitiu-me ainda a aplicação de conhecimentos adquiridos, ao longo do percurso académico, em ambiente empresarial e a obtenção de novos conhecimentos e de experiência profissional. Através da participação direta na empresa foi possível o conhecimento e compreensão do funcionamento da indústria alimentar e das diversas áreas no mercado de trabalho onde, com a minha formação, me posso inserir. Foi uma experiência bastante enriquecedora e uma mais valia para completar e consolidar a minha formação académica.

Capítulo IV – Bibliografia

1. Dan Cake - Quem Somos? Disponível em: www.dancake.pt. (Acedido a: 9 de Janeiro de 2017)
2. DRAPC. Segurança Alimentar: Síntese da Legislação. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro. 1–9 (2000).
3. Helsing, E. The History of Nutrition Policy. *Nutr. Rev.* **55**, S1–S3 (1997).
4. Graça, P. & Gregório, M. Evolução da Política Alimentar e de Nutrição em Portugal e suas relações com o contexto internacional. *Rev. SPCNA* **18**, 79–96 (2012).
5. EFSA, European Food Safety Authority. Disponível em: www.efsa.europa.eu/. (Acedido a: 19 de Dezembro de 2016)
6. *REGULAMENTO (CEE) N° 315/93 do Conselho de 8 de fevereiro de 1993 que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios.* (1993).
7. Ariseto, A. P., Marcolino, P. F. C., Vicente, E. & Sampaio, K. A. Ésteres de cloropropanóis e de glicidol em alimentos. *Química Nova* **36**, 1406–1415 (2013).
8. Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J. & Dolezal, M. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Addit. Contam.* **23**, 1290–1298 (2006).
9. Velisek, Jan; Davidek, Jiri ; Kubelka, Vladislav; Janicek, Gustav; Svobodova, Zdenka; Simicova, Z. New chlorine-containing organic compounds in protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1142–1144 (1980).
10. Lee, B. Q. & Khor, S. M. 3-Chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in Soy Sauce: A Review on the Formation, Reduction, and Detection of This Potential Carcinogen. *Food Sci. Food Saf.* **14**, 48–66 (2015).
11. Albuquerque, Tânia Gonçalves; Costa, Helena; Silva, Ana; Oliveira, M. B. Riscos e alimentos - Óleos e Azeites. *ASAE* 19–26 (2014).
12. Panel, E. & Chain, F. Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters , and glycidyl fatty acid esters in food EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J.* **14**, (2016).
13. Federal Institute for Risk Assessment. Collaborative Study for the Determination of 3-MCPD-Fatty Acid Esters in Edible Fats and Oils. 140 (2011). Disponível em: <http://www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf>. (Acedido a: 22 de Dezembro de 2016)
14. Bornscheuer, U. T. & Hesseler, M. Enzymatic Removal of 3-Monochloropropanediol (3-

- MCPD) and its Esters from Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* NA-NA (2010). doi:10.1002/ejlt.200900245
15. Eurofins Food & Feed Testing Germany. *3-MCPD and related compounds*. (2016).
 16. Raznim, R. A. *et al.* Detection and monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils. *Food Control* **25**, 355–360 (2012).
 17. European Commission. Collection and collation of data on levels of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) and related substances in foodstuffs. (2004). Disponível em: http://ec.europa.eu/food/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_mcpd_scoop_3-2-9_final_report_chloropropanols_en.pdf. (Acedido a: 10 de Janeiro de 2017)
 18. EFSA. *Chemicals in Food 2016 - Overview of selected data collection*. (2016). doi:10.1039/AN952770212b
 19. Weißhaar, R. 3-MCPD-esters in edible fats and oils - A new and worldwide problem. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 671–672 (2008).
 20. Jędrkiewicz R, Kupska M, Głowacz A, Gromadzka J, N. J. 3-MCPD: A Worldwide Problem of Food Chemistry. *Food Sci. Nutr.* **8398**, (2015).
 21. Edem, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: A review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **57**, 319–341 (2002).
 22. Gioielli, L. A. Óleos E Gorduras Vegetais: Composição E Tecnologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **5**, 211–232 (1996).
 23. Ramli, M. R. *et al.* Effects of degumming and bleaching on 3-MCPD esters formation during physical refining. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 1839–1844 (2011).
 24. Mandarino, J. M. G. & Roessing, A. C. Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos. (2001). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1019071/tecnologia-para-producao-do-oleo-de-soja-descricao-das-etapas-equipamentos-produtos-e-subprodutos>. (Acedido a: 29 de Novembro de 2016)
 25. Bragante, A. in *Alimentos Tecnologia e Operações* (2009).
 26. Craft, Brian; Destailats, Frederic; Sandoz, Laurence; Nagy, K. Refined plant oils free of glycidyl esters. **1**, (2014).
 27. MacMahon, S. *Processing Contaminants in Edible Oils, MCPD and Glycidyl Esters*. (2016).
 28. Science, F. *Toolbox for the Mitigation of 3-MCPD Esters and Glycidyl Esters in Food*. (2016).
 29. MPOB. *MPOB Statment on 3-MCPD Esters*. (2014).
 30. Association of the German Confectionery Industry. Background Paper MCPD and Glycidyl

- Fatty Acid Esters , including Free MCPD and Glycidol, in Foods. *EFSA J.* (2016).
31. Destailats, Frédéric ; Craft, Brian D.; Dubois, Mathieu; Nagy, K. Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism. *Food Chem.* **132**, 73–79 (2012).
 32. Clemens, R. Should the U.S. food industry be concerned about a 3-MCPD backlash? (2016). Disponível em: <http://www.palmoilhealth.org/news/u-s-food-industry-concerned-3-mcpd-backlash/>. (Acedido a: 26 de Novembro de 2016)
 33. FEDIOL. MCPD Esters and Glycidyl Esters. Review of mitigation measures. 1–17 (2015). Disponível em: [http://www.fediol.be/data/FEDIOL Review of Mitigation Measures MCPD Esters and Glycidyl Esters - 24 June 2015.pdf](http://www.fediol.be/data/FEDIOL%20Review%20of%20Mitigation%20Measures%20MCPD%20Esters%20and%20Glycidyl%20Esters%20-%2024%20June%202015.pdf). (Acedido a: 15 de Outubro de 2017)
 34. Sandoz, L., Craft, B., Destailats, F. & Nagy, K. Producing refined plant oils from washed crude plant oil. **1**, (2013).
 35. Benedetti, L. Plant for cleaning bins used for vegetable produce. (2011).
 36. Joint FAO/WHO Expert Committee. *WHO Food Additive Series: 58. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. International Journal of Food Microbiology* **62**, (2007).
 37. *Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.* (2012).
 38. EFSA. Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1 , 2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA J.* **11**, 1–45 (2013).
 39. LUBOMIR, K., Thomas, W. & Franz, U. *Proficiency Test on the Determination of 3-MCPD Esters in Edible Oil - Final Report.* (2010). doi:10.2787/2587
 40. Crews, C. *et al.* Analytical approaches for MCPD esters and glycidyl esters in food and biological samples: a review and future perspectives. *Food Addit. Contam. Part A* **49**, 1–35 (2012).
 41. EFSA. Commission Regulation on maximum levels for glycidyl esters in certain foods. (2017). Disponível em: <https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/in>. (Acedido a: 20 de Outubro de 2016)
 42. University of Sidney. Vibrational Spectroscopy Facility. Available at: <http://sydney.edu.au/science/chemistry/spectroscopy/introduction/what.shtml>.
 43. British Retail Consortium. *Global Standard Food safety.* (2015).
 44. IFS International Technical Committee. *International Featured Standards.* (2014).
 45. Dudeja, P., Gupta, R. K. & Minhas, A. S. *Food Safety in the 21st Century: Public Health*

- Perspective*. (2016).
46. Nova Rotulagem dos Alimentos já está em vigor. (2014). Disponível em: <http://www.tecnoalimentar.pt/>. (Acedido a: 10 de Janeiro de 2017)
 47. *Regulamento (UE) N° 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011*. (2014).
 48. European Commission. *Guidance Document For Competent Authorities For The Control Of Compliance With EU Legislation On: Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers*. **1**, (2012).
 49. *Regulamento (CE) N° 333/2007 da Comissão de 28 de março de 2007 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo dos teores de oligoelementos e de contaminantes derivados da transformação nos géneros alimentícios*. (2007).